

Búsqueda de enzimas lipolíticas termófilas y expresión en microorganismos mesófilos

Olalla López López

Directora:
María Isabel González Siso

Tese de Doutoramento 2015

Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía Celular e Molecular
Área de Bioquímica e Bioloxía Molecular
Grupo EXPRELA

El presente trabajo, “Búsqueda de enzimas lipolíticas termófilas y expresión en microorganismos mesófilos”, presentado por Olalla López López para aspirar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidade da Coruña.

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgado.

A Coruña, 3 de Junio de 2015.

VºBº

Dra. María Isabel González Siso
Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular

Olalla López López
Autora

La autora de este trabajo ha disfrutado de una bolsa de Tercer Ciclo (Diciembre de 2008 – Septiembre de 2009) y un contrato de investigación dentro del programa María Barbeito (Enero de 2010 – Junio de 2012) concedidas por la Xunta de Galicia; así como de contratos de investigación con cargo a los proyectos PGIDIT06REM38202PR (Noviembre de 2007 - Diciembre de 2008) y 09MDS037383PR (Julio de 2012 – Septiembre de 2012) financiados por la Xunta de Galicia, y al “Programa de consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas del Sistema Universitario de Galicia” (SUG), parcialmente cofinanciadas por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Feder) en el marco del Programa operativo de Galicia 2007-2013 (CN 2012/118).

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida a través de los proyectos PGIDIT06REM38202PR y 09MDS037383PR, concedidos por la Xunta de Galicia, y del “Programa de consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas del Sistema Universitario de Galicia” de la Xunta de Galicia durante los años 2008-2011 y 2012-2016 (UDC G000115), cofinanciados por FEDER (CEE).

A mis padres y a Adrián.

“Todo tiene que terminar en algún momento. De lo contrario, nada hubiera empezado”.

Doctor Who

Me gustaría agradecer en primer lugar a la Dra. M^a Isabel González Siso, por ofrecerme la oportunidad de trabajar en investigación y realizar los estudios de doctorado, una opción que yo no me había planteado. Me hubiera perdido no sólo la posibilidad de continuar formándome, sino también conocer a mucha gente con quien compartí y sigo compartiendo buenos ratos a lo largo de todos estos años, tanto en el laboratorio como fuera de él.

También quisiera agradecer a las personas del grupo de investigación del Departamento de Química Analítica y Alimentaria de la Facultad de Ciencias de Ourense, en especial a Marisa Rúa y Pablo Fuciños, que han colaborado con nosotros en la realización de los proyectos en los que está enmarcado este trabajo.

He estado 7 años en el laboratorio de Bioquímica. Durante este tiempo han pasado muchísimas personas por él, tantas, que si quisiera nombrarlas a todas seguro que se me olvidaría alguna, así que lo dejaré en un agradecimiento colectivo. Muchos de ellos ni siquiera llegarán a leer estos agradecimientos, pero me gustaría decir que son una parte muy importante de este trabajo; que su apoyo y las experiencias compartidas a lo largo de todos estos años son las que han hecho posible que haya llegado hasta aquí sin perder demasiado la cabeza. A pesar de ser una persona tímida, he conseguido tener un trato cercano con casi todas las personas con la que he coincidido y creo que cada una de ellas sabe lo que me ha aportado. Espero que se hayan dado cuenta de lo mucho que he valorado su compañerismo y amistad.

Por último, agradecer también a Adrián y a mi familia por su constante apoyo, creo que sin ellos esto no hubiera posible.

CONTENIDOS

Introducción	
Enzimas lipolíticas termófilas	15
Objetivos	37
Capítulo 1	
Búsqueda, selección y expresión heteróloga de enzimas lipolíticas de <i>Thermus thermophilus</i> HB27	39
Capítulo 2	
Metagenómica funcional para la búsqueda de enzimas lipolíticas en aguas termales	123
Conclusiones finales	177
Anexo I: Resumen	179
Anexo II: Curriculum vitae	185

La autora de este trabajo ha disfrutado de una bolsa de Tercer Ciclo (Diciembre de 2008 – Septiembre de 2009) y un contrato de investigación dentro del programa María Barbeito (Enero de 2010 – Junio de 2012) concedidas por la Xunta de Galicia; así como de contratos de investigación con cargo a los proyectos PGIDIT06REM38202PR (Noviembre de 2007 - Diciembre de 2008) y 09MDS037383PR (Julio de 2012 – Septiembre de 2012) financiados por la Xunta de Galicia, y al “Programa de consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas del Sistema Universitario de Galicia” (SUG), parcialmente cofinanciadas por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Feder) en el marco del Programa operativo de Galicia 2007-2013 (CN 2012/118).

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida a través de los proyectos PGIDIT06REM38202PR y 09MDS037383PR, concedidos por la Xunta de Galicia, y del “Programa de consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas del Sistema Universitario de Galicia” de la Xunta de Galicia durante los años 2008-2011 y 2012-2016 (UDC G000115), cofinanciados por FEDER (CEE).

A mis padres y a Adrián.

“Todo tiene que terminar en algún momento. De lo contrario, nada hubiera empezado”.

Doctor Who

Me gustaría agradecer en primer lugar a la Dra. M^a Isabel González Siso, por ofrecerme la oportunidad de trabajar en investigación y realizar los estudios de doctorado, una opción que yo no me había planteado. Me hubiera perdido no sólo la posibilidad de continuar formándome, sino también conocer a mucha gente con quien compartí y sigo compartiendo buenos ratos a lo largo de todos estos años, tanto en el laboratorio como fuera de él.

También quisiera agradecer a las personas del grupo de investigación del Departamento de Química Analítica y Alimentaria de la Facultad de Ciencias de Ourense, en especial a Marisa Rúa y Pablo Fuciños, que han colaborado con nosotros en la realización de los proyectos en los que está enmarcado este trabajo.

He estado 7 años en el laboratorio de Bioquímica. Durante este tiempo han pasado muchísimas personas por él, tantas, que si quisiera nombrarlas a todas seguro que se me olvidaría alguna, así que lo dejaré en un agradecimiento colectivo. Muchos de ellos ni siquiera llegarán a leer estos agradecimientos, pero me gustaría decir que son una parte muy importante de este trabajo; que su apoyo y las experiencias compartidas a lo largo de todos estos años son las que han hecho posible que haya llegado hasta aquí sin perder demasiado la cabeza. A pesar de ser una persona tímida, he conseguido tener un trato cercano con casi todas las personas con la que he coincidido y creo que cada una de ellas sabe lo que me ha aportado. Espero que se hayan dado cuenta de lo mucho que he valorado su compañerismo y amistad.

Por último, agradecer también a Adrián y a mi familia por su constante apoyo, creo que sin ellos esto no hubiera posible.

CONTENIDOS

Introducción	
Enzimas lipolíticas termófilas	15
Objetivos	37
Capítulo 1	
Búsqueda, selección y expresión heteróloga de enzimas lipolíticas de <i>Thermus thermophilus</i> HB27	39
Capítulo 2	
Metagenómica funcional para la búsqueda de enzimas lipolíticas en aguas termales	123
Conclusiones finales	177
Anexo I: Resumen	179
Anexo II: Curriculum vitae	185

INTRODUCCIÓN

Enzimas lipolíticas

1. Enzimas lipolíticas	17
1.1 ¿Qué es una enzima lipolítica?	17
1.2 Características estructurales y mecanismo catalítico	19
1.3 Distinción entre esterasas y lipasas	21
1.4 Clasificación de enzimas lipolíticas	21
1.5 Aplicaciones de las enzimas lipolíticas	21
2. Lipasas termófilas	24
2.1 Organismos termófilos y sus enzimas	24
2.2 Potencial biotecnológico e industrial de las enzimas termófilas	26
2.3 Producción de enzimas termófilas	27
2.4 Lipasas termófilas como biocatalizadores	28
3. Búsqueda de nuevas enzimas lipolíticas en la naturaleza	29
3.1 Búsqueda tradicional y “genome mining”	29
3.2 Metagenómica	30
4. Referencias	31

1. Enzimas lipolíticas: lipasas y esterasas

1.1 ¿Qué es una enzima lipolítica?

Las enzimas lipolíticas son miembros de la familia α/β hidrolasas que incluyen esterasas (EC 3.1.1.1, carboxil éster hidrolasas) y lipasas “verdaderas” (EC 3.1.1.3 triacilglicerol hidrolasas). Ambas catalizan la rotura de un enlace éster entre un alcohol y un ácido carboxílico en medios acuosos. En solventes orgánicos o medios con bajo contenido en agua también pueden llevar a cabo la reacción inversa, la formación de un enlace éster. Las reacciones de síntesis pueden ser de distintos tipos: esterificación (síntesis de un éster a partir de un ácido carboxílico y un alcohol) o transesterificación (intercambio de grupos entre un éster y un alcohol, reacción denominada alcoholólisis, un éster y un ácido, acidólisis, o dos ésteres, interesterificación) (Fig. 1) (Sharma & Kanwar, 2014).

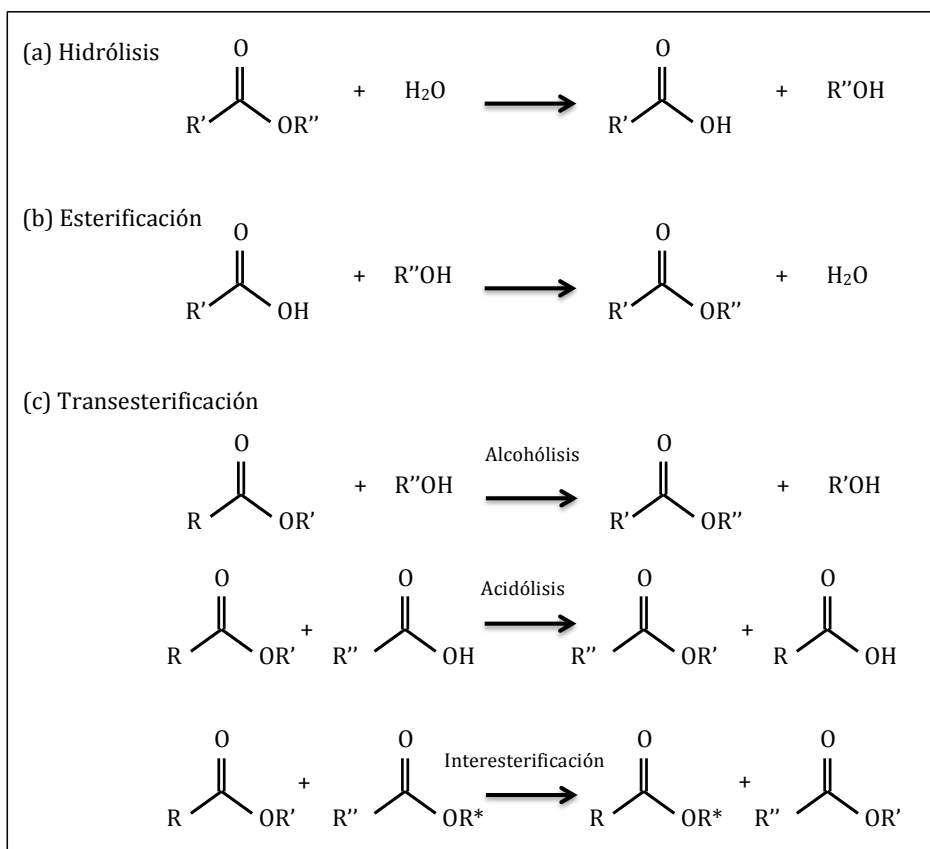


Figura 1: Representación esquemática de las reacciones típicas que puede catalizar una enzima lipolítica: hidrólisis (a) en presencia de agua; esterificación (b) y transesterificación (c) en medios no acuosos.

La función fisiológica de estas enzimas es la hidrólisis de triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, glicerol y ácidos grasos. Se encuentran ampliamente distribuidas en animales (como por ejemplo la lipasa pancreática de mamíferos y otras proteínas relacionadas), plantas (lipasas presentes en semillas oleaginosas y cereales en germinación), hongos y bacterias (donde no sólo están relacionadas con funciones metabólicas sino también con otros fenómenos, como la patogénesis bacteriana) (Jaeger *et al.*, 1999).

Las enzimas lipolíticas de origen microbiano (Tabla 1) presentan una enorme versatilidad, por la variedad de reacciones hidrolíticas y sintéticas que pueden llevar a cabo (Jaeger *et al.*, 1999). Además no necesitan cofactores y son estables y activas en solventes orgánicos (Bornscheuer, 2002).

Tabla 1: Principales productores de enzimas lipolíticas de origen microbiano (Nagarajan, 2012).

Grupo	Géneros productores de enzimas lipolíticas
Hongos filamentosos	<i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Humicola</i> , <i>Ashbya</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizomucor</i> , <i>Acremonium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Beauveria</i> , <i>Metarhizium</i> , <i>Eurotrium</i> y <i>Ophiostoma</i> .
Levaduras	<i>Candida</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Yarrowia</i> , <i>Geotrichum</i> y <i>Trichosporon</i> .
Bacterias	<i>Achromobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Staphylococcus</i> .

Una característica clave para comprender la importancia de las enzimas lipolíticas es su elevada especificidad, que se puede dividir en tres tipos (Kapoor & Gupta, 2012; Sharma & Kanwar, 2014):

- Quimioselectividad: especificidad según la naturaleza del sustrato. Pueden distinguir los ácidos grasos sobre los que actúan según su longitud, el número y posición de los enlaces dobles y otras características estructurales. También pueden distinguir entre diferentes tipos de alcoholes de los sustratos.
- Regioselectividad o selectividad posicional: hay enzimas que pueden hidrolizar los ésteres de ácidos grasos de los triglicéridos en cualquier posición al azar, mientras que otras muestran preferencia por aquellos situados en las posiciones C1 y C3 del glicerol. También hay enzimas lipolíticas que muestran especificidad por un tipo de ácidos grasos, e hidrolizan sus enlaces éster independientemente de su posición en el triglicéridos.
- Enantioselectividad: las enzimas lipolíticas tienen la capacidad de diferenciar los enantiómeros de sustrato en una mezcla racémica, y muestran preferencia por uno de ellos.

Estas características son la razón por la que las enzimas de origen microbiano son las más valoradas desde un punto de vista industrial, junto con un corto tiempo de generación, facilidad para la manipulación genética, escalado y purificación (Nagarajan, 2012).

1.2 Características estructurales y mecanismo catalítico

Las enzimas lipolíticas muestran una gran variedad en cuanto a secuencia primaria, a pesar de lo cual comparten una estructura y un mecanismo catalítico común. Presentan el plegamiento característico de las α/β hidrolasas, que consiste en un conjunto de ocho láminas β paralelas, a excepción de la segunda que es antiparalela, conectadas a través de cinco hélices α , entre las cuales se encuentra alojado el sitio activo (Fig. 2). Este sitio activo está formado por una tríada catalítica, Ser-Asp/Glu-His, y generalmente con la serina catalítica embebida en la secuencia consenso G-X-S-X-G. Los aminoácidos de la tríada catalítica se disponen siempre en el mismo orden a lo largo de la secuencia, y en posiciones específicas con respecto a la estructura secundaria: el residuo nucleofílico de serina se localiza inmediatamente a continuación de la lámina 5β , el residuo ácido de aspartato/glutamato en un giro a continuación de la lámina 7β , y el residuo de histidina en el "loop" situado después de la lámina 8β (Fig. 2) (Ollis *et al.*, 1992; Jaeger *et al.*, 1999).

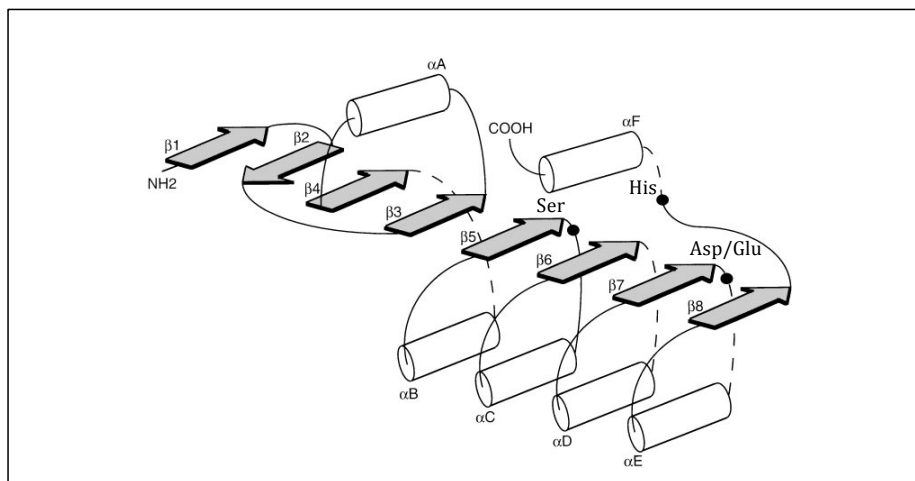


Figura 2: Representación del plegamiento canónico de las α/β hidrolasas. Las láminas β están representadas como flechas, las hélices α como cilindros, y la posición de los aminoácidos que constituyen la tríada catalítica está indicada con puntos negros. Imagen modificada de (Jaeger *et al.*, 1999).

Además existen dos aminoácidos que forman parte del "oxyanion hole" o bolsillo catalítico y que ayudan a estabilizar las formas intermedias durante la reacción enzimática: el que se sitúa inmediatamente a continuación de la serina catalítica y otro al final de la lámina 3β . También se han identificado regiones de la cadena proteica responsables de la acomodación de los sustratos, que se sitúan al continuación de las láminas β de la mitad carboxilo terminal de la enzima. Conforman unos sitios de unión a sustrato con longitud y arquitectura muy diversas, de acuerdo con la gran variedad de especificidades de sustrato que presentan las enzimas lipolíticas (Jaeger *et al.*, 1999).

Existen variaciones con respecto a este plegamiento, como por ejemplo enzimas con un número distinto de láminas beta o distinta localización de los aminoácidos catalíticos (Jaeger *et al.*, 1999), y también variaciones con respecto a la secuencia consenso que rodea a la serina catalítica y en algunas familias, alta homología con enzimas no lipolíticas (Arpigny & Jaeger, 1999).

El mecanismo catalítico para la formación y rotura de un enlace éster es el mismo para todas ellas y tiene lugar en dos pasos (Fig. 3) (Jaeger *et al.*, 1999; Bornscheuer, 2002):

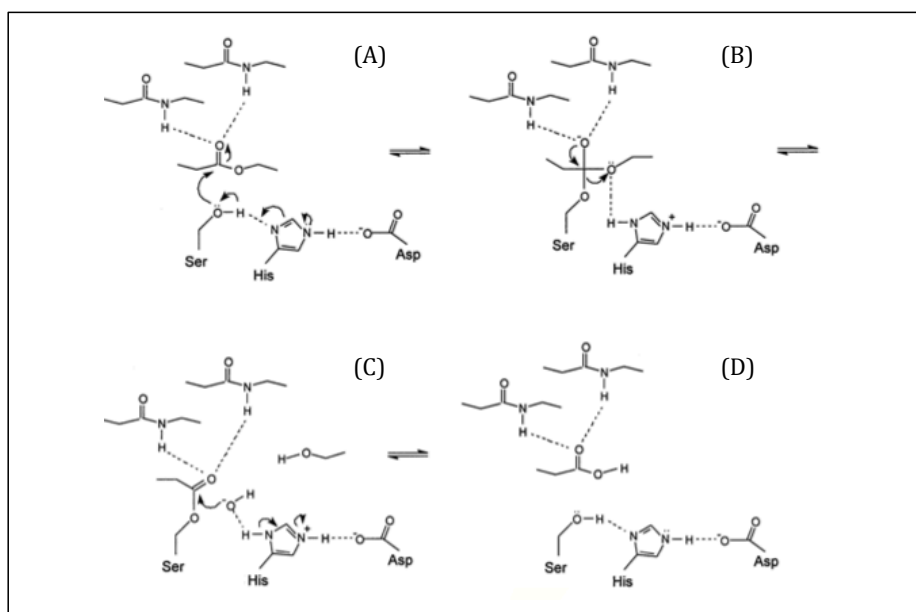


Figura 3: Mecanismo catalítico de las enzimas lipolíticas en una reacción de hidrólisis: A: Ataque nucleofílico al grupo carbonilo del enlace éster. B: Formación del intermediario tetrahédrico. C: Escisión del alcohol, formación del complejo acil-enzima y ataque nucleofílico por una molécula de agua. D: Resolución y liberación de un ácido graso. Imagen de (Jaeger *et al.*, 1999).

Primero tiene lugar la unión del sustrato a la serina catalítica: ataque nucleofílico del oxígeno del grupo hidroxilo al grupo carbonilo activado del enlace éster (Fig. 3A), dando lugar a un intermediario tetrahédrico estabilizado por el macrodipolo de la hélice αC (Fig. 2), los residuos catalíticos de His y Asp/Glu y por los grupos NH- de la cadena principal de aminoácidos que forman parte del bolsillo catalítico (Fig. 3B). A continuación el alcohol es escindido y se forma el complejo acil-enzima constituido por la enzima y el componente ácido del sustrato (Fig. 3C).

En segundo lugar tiene lugar la desacilación: El ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua, en una reacción de hidrólisis o por parte de un alcohol o éster en una

reacción de (trans-)esterificación forma un nuevo intermediario tetrahédrico, que tras la resolución dará lugar al producto, un ácido o un éster, y a la enzima libre (Fig. 3D).

1.3 Distinción entre esterasas y lipasas

El principal criterio para distinguir entre los dos tipos de enzimas lipolíticas, esterasas y lipasas “verdaderas”, es la especificidad de sustrato. Las esterasas hidrolizan ésteres solubles en agua, al menos parcialmente, con cadenas laterales cortas (< 10 átomos de carbono). Las lipasas, al contrario, muestran preferencia por sustratos insolubles en agua, ésteres con cadenas laterales largas (≥ 10 átomos de carbono) (Jaeger *et al.*, 1999; Fojan *et al.*, 2000).

Otra diferencia es la activación interfacial, un fenómeno que se presenta en gran parte de las lipasas pero en ninguna esterasa. Dichas lipasas poseen una “tapa” o dominio hidrofóbico que cubre el sitio activo, de modo que pueden encontrarse en dos conformaciones: una conformación abierta, en la que el sitio activo está accesible al sustrato y por tanto es enzimáticamente activa, y otra cerrada, en la que el sitio activo está cubierto por la tapa y es inactiva. El cambio conformacional del estado cerrado al abierto tiene lugar únicamente en presencia de una interfase lipídica o una emulsión del sustrato, que promueve la apertura de la tapa permitiendo la interacción del sustrato con el sitio activo, de carácter hidrofóbico, lo que conlleva a un aumento drástico de la actividad enzimática. Las esterasas por su parte, obedecen a una cinética clásica de tipo Michaelis–Menten (Bornscheuer, 2002).

1.4 Clasificación de las enzimas lipolíticas

Además de la clasificación entre lipasas y esterasas según su especificidad de sustrato, Arpigny & Jaeger (1999) diseñaron una clasificación de enzimas lipolíticas bacterianas en la que distinguieron distintas familias y subfamilias en función de motivos conservados de la secuencia aminoacídica y propiedades biológicas básicas. Dicha clasificación se sigue usando como referencia hoy en día para clasificar las nuevas enzimas lipolíticas, y se ha ido completando añadiendo familias y subfamilias a la clasificación original. Las características distintivas de cada familia y subfamilias se describen en la Tabla 2.

1.5 Aplicaciones de las enzimas lipolíticas

Las enzimas pueden actuar como biocatalizadores de transformaciones industriales y biotecnológicas permitiendo llevar a cabo los procesos químicos más complejos en condiciones de reacción suaves. Además, su uso presenta, frente a la catálisis química, la ventaja de una mayor especificidad, reduciendo la producción de compuestos secundarios no deseables (Littlechild *et al.*, 2007). Se ha estimado que el mercado

mundial de enzimas llegará a un volumen de 7,6 billones de dólares en el año 2015. Hasta hace poco, un 20% de dicho mercado se correspondía con enzimas lipolíticas, lo que nos permite hacernos una idea de su importancia como biocatalizadores industriales (Turki, 2013). Las enzimas lipolíticas se caracterizan por su capacidad para catalizar un amplio abanico de reacciones (Arpigny & Jaeger, 1999), y las de origen microbiano en concreto presentan mayor variedad de reacciones catalizadas y facilidad de obtención. Es por lo que se han convertido en uno de los grupos más importantes dentro de las enzimas comerciales.

Tabla 2: Clasificación de las enzimas lipolíticas según motivos conservados en su secuencia aminoacídica y propiedades biológicas (Arpigny & Jaeger, 1999).

Familia	Características de las enzimas de cada familia
I	<ul style="list-style-type: none"> Lipasas verdaderas. Contiene 6 subfamilias. Subfamilias I.1 y I.2: lipasas cuyo plegamiento depende de foldasas específicas y que comparten características estructurales como un puente disulfuro conservado y un sitio de unión a Ca^{2+}. Subfamilia I.3: lipasas más grandes que las de otras subfamilias cuya secreción se realiza a través de un sistema transportador ABC y que carecen de residuos Cys. Subfamilia I.4 y I.5: lipasas de organismos gram (+) como <i>Bacillus</i>, con el pentapéptido conservado A-X-S-X-G. Las de I.4 son muy pequeñas (20 kDa) mientras que las de I.5 son precursores de gran tamaño que dan lugar a una proteína madura de unos 400 aa. Subfamilia I.6: otras lipasas.
II	<ul style="list-style-type: none"> Pentapéptido modificado: G-D-S-(L) Esterasas de secreción y ligadas a membrana.
III	<ul style="list-style-type: none"> Enzimas extracelulares de especies de los géneros <i>Streptomyces</i> y <i>Moraxella</i> con similitud de secuencia con la del factor activador de plaquetas de humanos.
IV	<ul style="list-style-type: none"> Similitud de secuencia con la lipasa sensible a hormonas de mamíferos. Motivo típico: H-G-G. Procedentes de microorganismos psicrófilos, mesófilos y termófilos.
V	<ul style="list-style-type: none"> Motivo conservado H-G-G-G corriente arriba del pentapéptido G-D-S-A-G. Similitud de secuencia con enzimas no lipolíticas: epoxihidrolasas, deshalogenasas y haloperoxidasas. Procedentes de microorganismos psicrófilos, mesófilos y termófilos.
VI	<ul style="list-style-type: none"> Las esterasas más pequeñas conocidas (23–26 kDa). Similitud de secuencia con lisofosfolipasas de eucariotas.
VII	<ul style="list-style-type: none"> Esterasas bacterianas de gran tamaño (55 kDa). Similitud de secuencia con acetilcolinesterasas de eucariotas, y carboxilesterasas del intestino/hígado.
VIII	<ul style="list-style-type: none"> Similitud de secuencia con varias beta-lactamasas clase C. Distinto orden de los aminoácidos catalíticos en la secuencia aminoacídica. Serina catalítica en el motivo S-X-X-K.

Las enzimas lipolíticas pueden aceptar un amplio número de sustratos no naturales, por lo que son muy versátiles en la síntesis orgánica. La mayoría de los compuestos orgánicos de interés comercial son poco solubles y a veces inestables en medios acuosos por lo que requieren el empleo de solventes orgánicos. Además en estas condiciones la

reacción de síntesis es termodinámicamente favorable con respecto a la de hidrólisis, y se facilita la recuperación del producto y un mayor rendimiento global, evita reacciones secundarias, minimiza la desnaturalización y la desactivación y/o inhibición por sustrato/producto (Ghanem & Aboul-Enein, 2005). Además de los solventes orgánico en los últimos años se han desarrollado nuevos medios para reacciones de síntesis más respetuosos con el medio ambiente, entre los que se incluyen los líquidos iónicos (sustancias que están completamente compuestas por iones y que se mantienen en estado líquido por debajo de los 100°C) (Yang & Pan, 2005; van Rantwijk & Sheldon, 2007) y los “deep eutectic solvents” (DES) (formados al mezclar una sal de amonio o fosfonio con un donante de enlaces de hidrógeno) (Durand *et al.*, 2013). Las reacciones de síntesis catalizadas por las enzimas lipolíticas en medios orgánicos tienen múltiples aplicaciones en diferentes industrias:

- Síntesis de ésteres responsables del aroma y el sabor para la industria alimentaria (Adlercreutz, 2013).
- En la industria alimentaria también se emplean en la modificación de la composición de ácidos grasos de los triglicéridos, explotando la regioselectividad y quimioselectividad de las lipasas. Por este método, por ejemplo, se puede conseguir un producto con las mismas características que la manteca de cacao a partir del aceite de palma, la incorporación de ácidos grasos omega-3 a los lípidos, interesante por sus propiedades saludables (Adlercreutz, 2013), o la eliminación de ácidos grasos saturados para reducir el riesgo cardiovascular al consumir ciertos alimentos (Nagarajan, 2012).
- Producción de compuestos ópticamente puros principalmente por resolución de mezclas racémicas (Fig. 4), donde la enzima cataliza la formación del producto a partir de uno de los enantiómeros más rápidamente que a partir del otro (enantioselectividad). Se emplean, por ejemplo, en la producción de fármacos (Bornscheuer, 2002; Ghanem & Aboul-Enein, 2005; Sharma *et al.*, 2011; Adlercreutz, 2013).
- Producción de surfactantes y compuestos responsables del aroma en la industria cosmética y perfumería (Sharma & Kanwar, 2014).
- En la industria papelera, para la eliminación de las resinas de pulpa del papel (Sharma *et al.*, 2011).
- Síntesis de biopolímeros (Nagarajan, 2012).

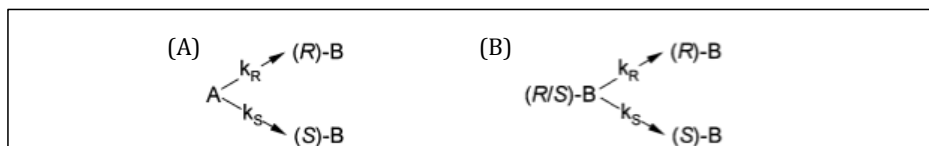


Figura 4: Esquema de los dos métodos principales para la obtención de compuestos enantioméricamente puros. A: Síntesis estereoselectiva: a partir de un sustrato se sintetiza un enantiómero. B: Resolución de racematos: a partir de una mezcla racémica de dos enantiómeros la enzima cataliza la formación del producto a partir de uno de ellos mucho más rápidamente que a partir del otro. Imagen de Ghanem & Aboul-Enein (2005).

Otra de las aplicaciones más importantes, dada la gran demanda mundial del producto, es en la industria de detergentes donde se usan como aditivos para eliminar las manchas de grasa, en combinación con enzimas proteasas y celulasas. Su resistencia a la desnaturalización al mismo tiempo que mantienen altos niveles de actividad en presencia de detergentes y/o inhibidores explica el interés que despiertan en este campo (Sharma *et al.*, 2011).

Existen otros campos donde el uso de las lipasas es muy prometedor, como biosensores en el diagnóstico clínico (por ejemplo para detectar pancreatitis) (Sharma *et al.*, 2011; Nagarajan, 2012) o formando parte de ensayos basados en lipasas para la detección de secuencias de DNA específicas (Nagarajan, 2012); y también tienen un gran potencial en la producción de biodiésel como alternativa a la producción por medio de catálisis alcalina, que domina la industria actualmente debido a que es barata y rápida, pero que resulta muy agresiva con el medio ambiente (Adlercreutz, 2013).

Nuevos campos que también pueden beneficiarse del uso de estas enzimas son el tratamiento de residuos y la biorremediación (vertidos de aceite de refinerías, suelos contaminados, residuos de restaurantes) (Sharma *et al.*, 2011).

El uso de enzimas en un proceso industrial requiere que el proceso resulte económicamente viable, ya que son relativamente caras. Por tanto, uno de los puntos clave de los que depende es la estabilidad de la enzima, que determina la duración de su vida útil. La mejora mediante ingeniería genética de las enzimas lipolíticas ya conocidas junto con el desarrollo de nuevos métodos de inmovilización (Mateo *et al.*, 2007) que conducen a mejorar la estabilidad y, en algunas ocasiones, la enantioselectividad de las enzimas, es un campo que está en constante avance. Otra alternativa es la búsqueda de nuevas enzimas con nuevas características de especificidad de sustrato y/o mayor estabilidad, que permitan establecer nuevas aplicaciones u optimizar los procesos industriales existentes. Uno de los nichos de búsqueda de especial importancia, debido a ser una fuente de enzimas notablemente termoestables, son los organismos termófilos.

2. Lipasas termófilas

2.1 Organismos termófilos y sus enzimas

Los microorganismos extremófilos son aquellos que habitan en lugares donde están sometidos a condiciones extremas, tales como elevadas temperaturas (termófilos), frío extremo (psicrófilos), valores de pH muy bajos (acidófilos) o muy altos (alcalófilos), alta concentración de sales (halófilos) o altas presiones (barófilos). Estos organismos están adaptados a su entorno de modo que todas sus funciones biológicas, y por tanto las

Introducción

enzimas que las llevan a cabo, están diseñadas para funcionar en las duras condiciones en las que viven.

Dentro de los extremófilos, aquellos adaptados a la vida a altas temperaturas son los termófilos (con temperatura óptima de crecimiento entre 45-80°C) y los hipertermófilos (con temperaturas óptimas de crecimiento mayores de 80°C, y que raramente son capaces de crecer a menos de 60°C). Las elevadas temperaturas suelen venir acompañadas de otras condiciones como alta salinidad, alta presión, pH ácidos o básicos, también extremas.

La búsqueda de las características que permiten a los termófilos sobrevivir a altas temperaturas, algunas incluso superiores al punto de ebullición del agua, y en concreto, aquellas que permiten que sus proteínas se mantengan activas y correctamente plegadas han sido objeto de estudio. Sus membranas celulares son ricas en ácidos grasos saturados, que mantienen a la célula lo suficientemente rígida para sobrevivir a altas temperaturas, y en su ADN contienen una girasa de ADN reversa que produce hélices de ADN superenrolladas elevando su punto de fusión hasta, al menos, la temperatura máxima de crecimiento. Sus enzimas suelen mantenerse estables y activas incluso a temperaturas superiores a su temperatura de crecimiento (Haki & Rakshit, 2003).

Análisis comparativos de proteínas mesófilas y sus homólogas termófilas (Kumar & Nussinov, 2001; Li *et al.*, 2005; Sælensminde *et al.*, 2009), así como de proteínas obtenidas por evolución dirigida con una mayor termoestabilidad (Wintrobe *et al.*, 2003), no han encontrado grandes diferencias ni a nivel de secuencia ni a nivel estructural. Más que una única estrategia común, las evidencias sugieren que la adquisición de una mayor termoestabilidad vendría dada por combinaciones de sutiles cambios en la estructura y composición aminoacídica, diferentes para cada proteína termófila. Ni siquiera se ha alcanzado un consenso acerca de cuales son los factores estructurales y de secuencia que más influyen en la mejora de la estabilidad a altas temperaturas. Entre los factores mencionados en los distintos estudios podemos encontrar: agrupación de cargas, redes de puentes de hidrógeno adicionales, optimización del empaquetamiento y reducción del número y tamaño de las cavidades internas, aumento del número de aminoácidos cargados a expensas de aminoácidos polares sin carga, ocultamiento de la superficie hidrofóbica y núcleo más hidrofóbico, incremento del área oculta por oligomerización, reducción de los aminoácidos inestables a altas temperaturas, aumento de estructuras secundarias (hélices), formación de puentes salinos adicionales, especialmente en la superficie, y mayor contenido en prolina, entre otros.

Las lipasas termófilas, concretamente, también han sido objeto de este tipo de estudio comparativo, y en general presentan las mismas adaptaciones que las demás proteínas termófilas (Tyndall *et al.*, 2002), aunque también se ha descubierto alguna nueva variante de adaptación como un aumento del número de giros gamma inversos en los

extremos amino y carboxilo terminal de las hélices alfa y láminas beta (Chakravorty *et al.*, 2011).

Todas estas adaptaciones conducirían a un aumento de la rigidez conformacional de la estructura proteica. Pero esta rigidez es relativa, ya que las proteínas termófilas presentarían una flexibilidad a altas temperaturas equiparable a la de las proteínas mesófilas a temperaturas moderadas (Kumar & Nussinov, 2001). Por tanto, se trataría de adaptaciones dirigidas a mantener una conformación flexible y funcional de la enzima bajo las condiciones de temperatura de su hábitat natural, compensando la mayor movilidad estructural (vibraciones) provocada por las elevadas temperaturas (Fields, 2001). A su vez, esta característica dificulta la catálisis a temperaturas moderadas, aunque no en todos los casos, presentando en general una actividad enzimática reducida debido a su excesiva rigidez (Elias *et al.*, 2014).

Los avances en este campo conducen a una mejor comprensión de las bases de la termoestabilidad, lo que es de vital importancia a la hora de llevar a cabo el diseño racional de enzimas para uso industrial, ya sean variantes termoestables de enzimas mesófilas o variantes de proteínas termófilas con mayor actividad a temperaturas moderadas. El proceso es complejo, ya que supone elegir una zona de la enzima para la modificación y decidir qué tipo de mutación introducir cuando aún no se puede generalizar el efecto de un determinado tipo de mutación sobre la estabilidad, sino que hay que tener siempre en cuenta el contexto estructural (Eijsink *et al.*, 2004). De hecho, los resultados de los experimentos de evolución dirigida mediante métodos aleatorios sugieren que existen maneras de estabilizar una proteína que no son fáciles de explicar o predecir mediante el enfoque racional (Eijsink *et al.*, 2005).

2.2 Potencial biotecnológico e industrial de las enzimas termófilas

A pesar de las ventajas que supone la catálisis enzimática, el problema de las enzimas es que no siempre son estables en las condiciones de reacción que se requieren para los procesos industriales. La búsqueda continua de catalizadores más robustos, así como de nuevas especificidades que permitan extender el uso de la catálisis enzimática a una mayor variedad de aplicaciones, persigue mejorar el rendimiento de estos procesos.

El interés industrial que suscitan las enzimas procedentes de microorganismos termófilos es debido tanto a su inherente termoestabilidad como a su resistencia a valores extremos de pH, presencia de agentes desnaturalizantes y enzimas proteolíticas. Estas características las convierten en biocatalizadores más adecuados que sus homólogas mesófilas, para soportar las duras condiciones en las que tienen lugar los procesos industriales, reteniendo su actividad catalítica y especificidad.

Las enzimas termófilas ya se emplean de forma generalizada para determinados fines industriales y biotecnológicos, entre los cuales cabe destacar el uso de amilasas para la

Introducción

producción de glucosa y fructosa a partir de almidón, xilanasas en la industria papelera, proteasas para detergentes e industria alimentaria, y DNA polimerasas en ingeniería genética (Demirjian *et al.*, 2001).

La característica más destacable de las proteínas termófilas, su termoestabilidad, tiene una consecuencia directa, que es una vida media mayor que la de sus homólogas mesófilas. Esto se traduce en una larga vida útil, reduciendo los costes a lo largo de las sucesivas reacciones de biotransformación. Adicionalmente, poder llevar a cabo las transformaciones biotecnológicas y los procesos industriales a altas temperaturas aporta otra serie de ventajas como la reducción del riesgo de contaminación por mesófilos y una mayor tasa de reacción, gracias a la disminución de la viscosidad y el aumento del coeficiente de difusión y solubilidad del sustrato (Niehaus *et al.*, 1999; Haki & Rakshit, 2003). Es de especial interés su aplicación en procesos en los que están involucrados sustratos o productos poco solubles en agua, ya que se elimina la necesidad de emplear solventes orgánicos, reduciendo los costes del proceso y siendo éste menos perjudicial para el medio ambiente.

Por otra parte, existen ciertas aplicaciones que se verían beneficiadas por el uso de enzimas estables pero no pueden realizarse a elevadas temperaturas, como en el caso de determinadas reacciones de la química fina, por inestabilidad de los sustratos a altas temperaturas, o la adición de enzimas a detergentes para lavado a bajas temperaturas, entre otros. El problema de aplicación a estas situaciones concretas, viene dado por el hecho de que las proteínas termófilas suelen mostrar un reducido nivel de actividad a temperaturas moderadas debido a la rigidez de su estructura a dichas temperaturas, y la búsqueda de enzimas que se adapten a estos procesos es crucial.

2.3 Producción de enzimas termófilas

Para implantar el uso de enzimas como biocatalizadores en procesos industriales o aplicaciones biotecnológicas es necesario contar con un sistema de producción y purificación, que permita la obtención de las enzimas en grandes cantidades de forma sencilla y rentable. La producción de enzimas termófilas a partir de sus fuentes originales, los organismos termófilos, suele presentar ciertos obstáculos entre los que se incluyen bajos rendimientos en la producción de enzimas, crecimiento lento, requerimientos nutritivos específicos (minerales, aminoácidos o vitaminas), necesidad de mantener una alta temperatura para el crecimiento, evaporación del medio de cultivo, corrosión del equipamiento y disminución de la solubilidad de los gases (Schiraldi & De Rosa, 2002). En el caso de las lipasas hay que añadir que éstas se suelen producir en estadíos avanzados de crecimiento (Haki & Rakshit, 2003).

La posibilidad de clonación de los genes que codifican estas proteínas bajo el control de fuertes promotores para su sobreexpresión en organismos mesófilos, de crecimiento más rápido, supone una alternativa más eficiente para la obtención de estas enzimas a

gran escala. La mayoría de las enzimas termófilas expresadas a temperaturas bajas se pliegan de manera correcta y conservan su termoestabilidad (Niehaus *et al.*, 1999). Y si además el sistema de expresión heteróloga empleado conduce a la secreción de la proteína recombinante al medio extracelular, presenta la ventaja añadida de una recuperación más sencilla.

Escherichia coli es uno de los organismos utilizados para la producción de enzimas recombinantes de manera rápida obteniendo un gran rendimiento. Las levaduras, por su parte, también son consideradas apropiadas para la producción industrial a gran escala (Schiraldi & De Rosa, 2002). *Saccharomyces cerevisiae*, un microorganismo considerado seguro o GRAS ("Generally Regarded As Safe"), es la levadura más ampliamente empleada como hospedador de expresión en la producción heteróloga de enzimas, y existen numerosas cepas que han sido modificadas genéticamente para convertirlas en adecuados microorganismos secretores.

2.4 Lipasas termófilas como biocatalizadores

La mayoría de los procesos industriales en los que se emplean lipasas se llevan a cabo a una temperatura de reacción superior a los 45°C (Haki & Rakshit, 2003) por lo que requieren lipasas con cierto grado de termoestabilidad. Por ejemplo, las lipasas termoestables pueden emplearse para el procesamiento enzimático de lípidos, que son sólidos a temperatura ambiente y requieren una temperatura mayor de 50°C para el procesamiento líquido (Cho *et al.*, 2000). Las lipasas que se usan en los detergentes deben ser termoestables y permanecer activas en los ambientes alcalinos típicos de una lavadora (Sharma *et al.*, 2011).

Uno de los campos en los que se está investigando la aplicación de enzimas lipolíticas termófilas como biocatalizadores es la producción de biodiésel, un combustible renovable que podría reducir la dependencia de recursos fósiles. Actualmente, la producción se lleva a cabo por medio de catálisis química, que requiere aceites de partida homogéneos y de alta calidad, además de ser altamente perjudicial para el medio ambiente, pero que resulta más rentable que el proceso enzimático debido al alto coste de producción de las enzimas, en especial de su inmovilización (Nielsen *et al.*, 2008). La producción enzimática reduciría la cantidad de productos residuales y el consumo de energía, además de posibilitar el uso de otros aceites de menor calidad como material de partida, tales como aceites de fritura, grasas de desecho, sebo, manteca de cerdo o ácidos grasos libres (Szczesna Antczak *et al.*, 2009). La producción enzimática de biodiésel consiste en una reacción de transesterificación de triacilglicéridos con metanol o etanol para obtener metil/etil ésteres de ácidos grasos libres, el biodiesel, y glicerol (Fig. 5). La reacción de transesterificación está catalizada por lipasas y se lleva a cabo a temperaturas entre 30 y 50°C. La tasa de reacción aumenta con la temperatura, pero la estabilidad de las lipasas descende. Este es el motivo de que sea de gran utilidad la aplicación de lipasas termófilas en este proceso

industrial, tanto para obtener mayores tasas de bioconversión como para tener un biocatalizador operacionalmente estable, que pueda ser aplicado en la producción continua de biodiésel (Szczesna Antczak *et al.*, 2009).

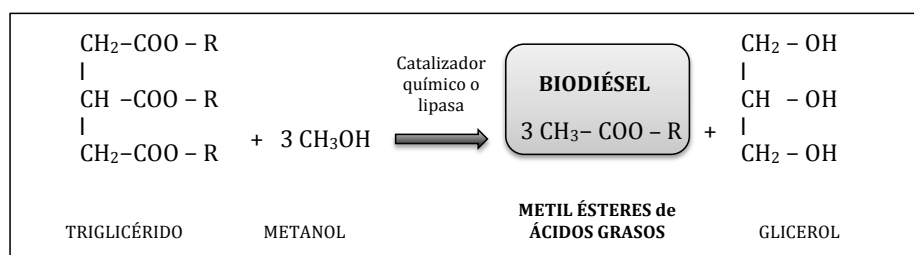


Figura 5: Esquema de la reacción de producción de biodiésel.

3. Búsqueda de nuevas enzimas lipolíticas en la naturaleza

Aunque ya existen muchas enzimas lipolíticas comerciales disponibles, la demanda de nuevas enzimas que se ajusten mejor a los procesos industriales está siempre en aumento y las estrategias empleadas para su búsqueda han ido evolucionando con el tiempo.

3.1 Búsqueda tradicional y “genome mining”

El aislamiento y cultivo de cepas productoras de enzimas lipolíticas es el método utilizado tradicionalmente para descubrir nuevas esterasas y lipasas. Esta tarea se ha visto facilitada gracias a la existencia de ensayos sencillos para detectar la presencia de dichas enzimas, como las placas de medio sólido con sustratos lipídicos emulsionados, donde se detecta la producción de enzimas lipolíticas por medio de la formación de halos de hidrólisis. A día de hoy esta estrategia aún se sigue utilizando.

Con la automatización de los métodos de secuenciación surgieron numerosos proyectos genómicos que proporcionaron una inmensa cantidad de información genética. Esta información se puede utilizar para buscar nuevas secuencias que codifiquen nuevas lipasas/esterasas por homología con las ya conocidas, para ser posteriormente clonadas, expresadas, purificadas y caracterizadas bioquímicamente. Al basarse en búsquedas por homología, el factor limitante de esta estrategia es la incapacidad de detectar aquellas enzimas que no se parezcan a las que se conocen hasta el momento.

Un ejemplo de fuente de nuevas enzimas lipolíticas con potencial industrial es *Thermus thermophilus* HB27. Es un microorganismo termófilo cuyo genoma ha sido completamente secuenciado (Henne *et al.*, 2004) y cuya producción de enzimas lipolíticas ha sido estudiada y se ha comprobado que produce al menos dos enzimas

distintas, de 62 y 34 kDa (Fuciños *et al.*, 2005). La de menor tamaño ha sido identificada como la proteína YP_004875, anotada como putativa esterasa en el genoma (Fuciños *et al.*, 2011). La búsqueda e identificación de otras enzimas lipolíticas y la producción heteróloga en organismos mesófilos de las enzimas identificadas sería el siguiente paso a seguir en este estudio.

3.2 Metagenómica

La Metagenómica consiste en el estudio del conjunto de genomas de una comunidad microbiana medioambiental, también llamado metagenoma. El origen de las muestras medioambientales a partir de las que se extrae el ADN total o metagenoma, puede ser muy variado, desde un medio natural hasta la microbiota de ciertos organismos, pasando por lugares alterados por el hombre, como por ejemplo un suelo contaminado. Las técnicas actuales de biología molecular permiten construir metagenotecas a partir de ADN ambiental total, incluyendo los genomas de los organismos no cultivables.

La era de la Metagenómica significó un paso adelante en el campo de la búsqueda de nuevos biocatalizadores. Hasta ese momento, las fuentes de nuevas enzimas estaban técnicamente limitadas a una fracción minoritaria de la diversidad microbiana, los microorganismos cultivables. Si tenemos en cuenta que se ha estimado que dichos microorganismos representan menos de un 1% de la diversidad real en la mayoría de los ambientes (Amann *et al.*, 1995), los microorganismos no cultivables esconden una riqueza potencial incalculable.

Mediante búsquedas funcionales en las metagenotecas se pueden detectar clones que exhiban una determinada actividad enzimática de interés, abriendo la puerta al descubrimiento de enzimas desconocidas que podrían tener propiedades nuevas y únicas. El creciente número de enzimas de interés industrial descubiertas a través de estudios metagenómicos muy pronto superará el número de enzimas descubiertas mediante técnicas tradicionales. Hay que destacar que, por ahora, la búsqueda de nuevos biocatalizadores por medio de metagenómica está centrado en un pequeño grupo de enzimas, entre las que están incluidas las lipasas y las esterasas (Handelsman *et al.*, 1998; Streit *et al.*, 2004). Ya se han descubierto numerosas enzimas lipolíticas pertenecientes a nuevas familias y subfamilias, a mayores de las descritas en la clasificación de Arpigny y Jaeger (Fig. 6) (Arpigny & Jaeger, 1999).

Las aguas termales son la principal fuente natural de microorganismos termófilos, por tanto, representan el lugar de estudio idóneo para la búsqueda de nuevas enzimas lipolíticas mediante metagenómica.

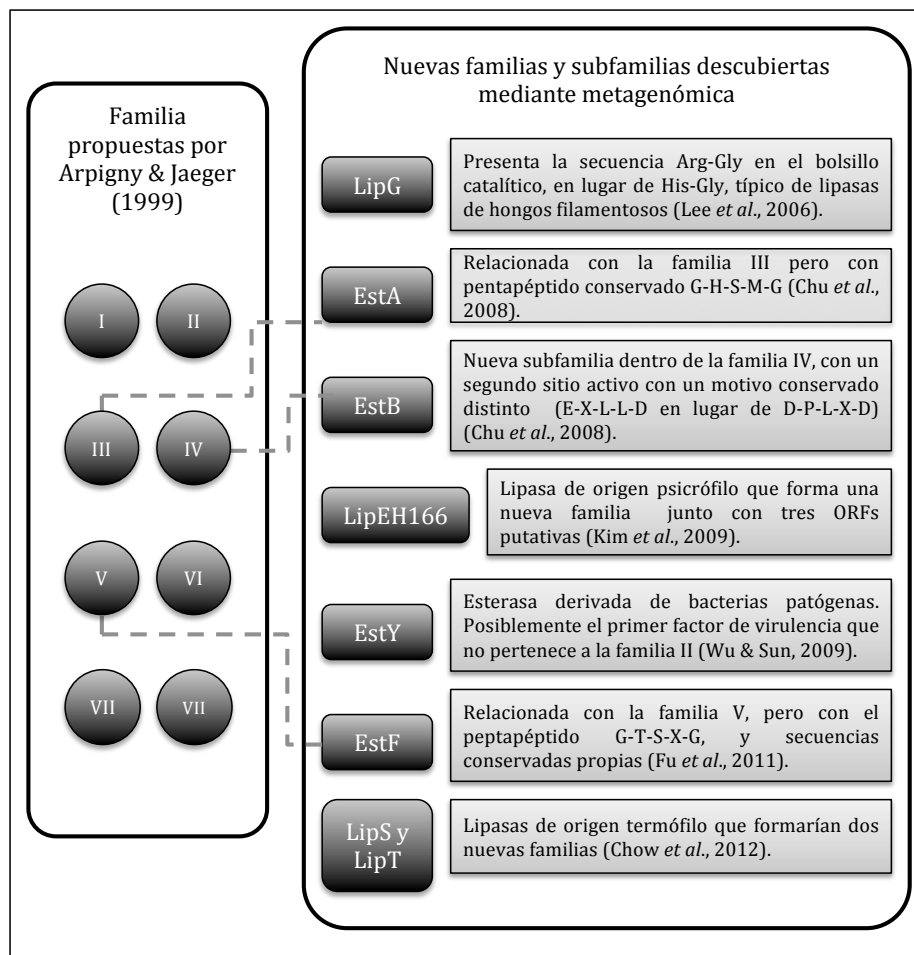


Figura 6: Enzimas lipolíticas representantes de nuevas familias o subfamilias de enzimas lipolíticas bacterianas descubiertas por medio de metagenómica (Arpigny & Jaeger, 1999) (Tabla 2).

4. Referencias

- Adlercreutz, P.** (2013). Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chemical Society Reviews* 42 (15): 6406-6436.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H.** (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59 (1): 143-169.
- Arpigny, J.L., Jaeger K.-E.** (1999). Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. *Biochemical Journal* 343 (1): 177-183.

Bornscheuer, U.T. (2002). Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews* 26 (1): 73-81.

Chakravorty, D., Parameswaran, S., Dubey, V.K., Patra, S. (2011). *In silico* characterization of thermostable lipases. *Extremophiles* 15 (1): 89-103.

Cho, A.-R., Yoo, S.-K., Kim, E.-J. (2000). Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters* 186 (2): 235-238.

Chow, J., Kovacic, F., Dall Antonia, Y., Krauss, U., Fersini, F., Schmeisser, C., et al. (2012). The metagenome-derived enzymes LipS and LipT increase the diversity of known lipases. *PLoS ONE* 7(10): e47665.

Chu, X., He, H., Guo, C., Sun, B. (2008). Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (4): 615-625.

Demirjian, D.C., Morís-Varas, F., Cassidy, C.S. (2001) Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology* 5 (2): 144-151.

Durand, E., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2013). Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *European Journal of Lipid Science and Technology* 115 (4): 379-385.

Eijsink, V.G.H., Bjørk, A., Gåseidnes, S., Sirevåg, R., Synstad, B., Burg, B.V.D., et al. (2004). Rational engineering of enzyme stability. *Journal of Biotechnology* 113 (1-3): 105-20.

Eijsink, V.G.H., Gåseidnes, S., Borchert, T.V., Van Den Burg, B. (2005). Directed evolution of enzyme stability. *Biomolecular Engineering* 22 (1-3): 21-30.

Elias, M., Wieczorek, G., Rosenne, S., Tawfik, D.S. (2014). The universality of enzymatic rate-temperature dependency. *Trends in Biochemical Science* 39 (1): 1-7.

Fields, P.A. (2001). Review: Protein function at thermal extremes: Balancing stability and flexibility. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 129 (2-3): 417-431.

Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N., Petersen, S.B. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* 82 (11): 1033-1041.

Fu, C., Hu, Y., Xie, F., Guo, H., Ashforth, E.J., Polyak, S.W., et al. (2011). Molecular cloning and characterization of a new cold-active esterase from a deep-sea metagenomic library. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(3): 961-70.

Fuciños, P., Abadín, C.M., Sanromán, A., Longo, M.A., Pastrana, L., Rúa, M.L. (2005). Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus*

HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterisation. *Journal of Biotechnology* 117 (3): 233-241.

Fuciños, P., Pastrana, L., Sanromán, A., Longo, M.A., Hermoso, J.A., Rúa, M.L. (2011). An esterase from *Thermus thermophilus* HB27 with hyper-thermoalkalophilic properties: Purification, characterisation and structural modelling. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 70 (3-4): 127-137.

Ghanem, A., Aboul-Enein, H.Y. (2005). Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality* 17 (1): 1-15.

Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology* 89 (1): 17-34.

Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry and Biology* 5 (10): R245-249.

Henne, A., Brüggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., et al. (2004). The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nature Biotechnology* 22 (5): 547-553.

Jaeger, K.-E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology* 53: 315-351.

Kapoor, M., Gupta, M.N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry* 47 (4): 555-569.

Kim, E.-Y., Oh, K.-H., Lee, M.-H., Kang, C.-H., Oh, T.-K., Yoon, J.-H. (2009). Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (1): 257-260.

Kumar, S., Nussinov, R. (2001). How do thermophilic proteins deal with heat? *Cellular and Molecular Life Sciences* 58 (9): 1216-1233.

Lee, M.-H., Lee, C.-H., Oh, T.-K., Song, J.K., Yoon, J.-H. (2006). Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: Evidence for a new family of bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (11): 7406-7409.

Li, W.F., Zhou, X.X., Lu, P. (2005). Structural features of thermozymes. *Biotechnology Advances* 23 (4): 271-281.

Littlechild, J.A., Guy, J., Connelly, S., Mallett, L., Waddell, S., Rye, C.A., et al. (2007). Natural methods of protein stabilization: Thermostable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions* 35 (6): 1558-1563.

- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R.** (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (6): 1451-1463.
- Nagarajan, S.** (2012). New tools for exploring old friends-microbial lipases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168 (5): 1163-1196.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., Antranikian, G.** (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 (6): 711-729.
- Nielsen, P.M., Brask, J., Fjerbaek, L.** (2008). Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110 (8): 692-700.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., *et al.*** (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering* 5 (3): 197-211.
- Sælensminde, G., Halskau Jr., Ø., Jonassen, I.** (2009). Amino acid contacts in proteins adapted to different temperatures: Hydrophobic interactions and surface charges play a key role. *Extremophiles* 13 (1): 11-20.
- Schiraldi, C., De Rosa, M.** (2002). The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends in Biotechnology* 20 (12): 515-521.
- Sharma, D., Sharma, B., Shukla, A.K.** (2011). Biotechnological approach of microbial lipase: A review. *Biotechnology* 10 (1): 23-40.
- Sharma, S., Kanwar, S.S.** (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal* 2014.
- Streit W.R., Schmitz, R.A.** (2004). Metagenomics: the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology* 7 (5): 492-498.
- Szczesna Antczak, M., Kubiak, A., Antczak, T., Bielecki, S.** (2009). Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy* 34 (5): 1185-1194.
- Turki S.** (2013). Towards the development of systems for high-yield production of microbial lipases. *Biotechnology Letters* 35 (10): 1551-1560.
- Tyndall, J.D.A., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, L.A., Taylor, P., Walkinshaw, M.D.** (2002). Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *Journal of Molecular Biology* 323 (5): 859-869.
- van Rantwijk, F., Sheldon, R.A.** (2007). Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical Reviews* 107 (6): 2757-2785.

Introducción

Wintrode, P.L., Zhang, D., Vaidehi, N., Arnold, F.H., Goddard III, W.A. (2003). Protein dynamics in a family of laboratory evolved thermophilic enzymes. *Journal of Molecular Biology* 327 (3): 745-757.

Wu, C., Sun, B. (2009). Identification of novel esterase from metagenomic library of Yangtze River. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (2): 187-193.

Yang, Z., Pan, W. (2005). Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology* 37 (1): 19-28.

OBJETIVOS

Los objetivos propuestos para esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Construcción de cepas productoras de enzimas lipolíticas, clonando los genes que codifican una putativa esterasa y otra enzima lipolítica seleccionada entre las anotadas en el genoma de *Thermus thermophilus* HB27, en un hospedador mesófilo, la levadura *Sacharomyces cerevisiae* BJ3505; así como el estudio de la producción, la caracterización de las enzimas recombinantes (especificidad de sustrato, pH óptimo, Tª óptima, termoestabilidad, actividad lipolítica en función de la concentración de sustrato) y aproximación a la cristalización de la esterasa recombinante.
2. Búsqueda de nuevas enzimas lipolíticas en el genoma de *Thermus thermophilus* HB27 mediante construcción de una genoteca y selección funcional de clones con actividad lipolítica en presencia de tributirina.
3. Construcción de dos metagenotecas de un manantial termal con el fósido pCC1FOS: la primera metagenoteca a partir del ADN extraído de un cultivo de enriquecimiento (empleando aceite de oliva como única fuente de carbono y usando como inóculo sedimentos procedentes de un manantial termal) y la segunda a partir del ADN metagenómico extraído de los microorganismos de las aguas termales. Selección funcional de clones con actividad lipolítica en presencia de tributirina. Identificación, clonación, expresión en un hospedador mesófilo y caracterización de al menos una de las enzimas lipolíticas descubiertas.

CAPÍTULO 1:

Búsqueda, selección y expresión heteróloga de enzimas lipolíticas de *Thermus thermophilus* HB27

1. Introducción	41
1.1 El género <i>Thermus</i> y sus enzimas de interés	41
1.2 La especie <i>T. thermophilus</i>	42
1.3 Enzimas lipolíticas de <i>T. thermophilus</i> HB27	42
1.4 Cristalización de proteínas termófilas	44
1.5 Resumen de los objetivos de este capítulo	45
2. Materiales y métodos	46
2.1 Material biológico	46
2.2 Métodos microbiológicos	48
2.3 Técnicas de manipulación de ADN	52
2.4 Construcción de cepas recombinantes con YEpFLAG-1 en <i>S. cerevisiae</i> BJ3505	57
2.5 Construcción y búsqueda funcional de la genoteca de <i>T. thermophilus</i> HB27	60
2.6 Métodos analíticos	64
2.7 Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica	68
2.8 Métodos de extracción de proteínas	69
2.9 Técnicas electroforéticas	70
2.10 Métodos de manipulación de proteínas	73
2.11 Técnicas cromatográficas	75
2.12 Técnicas cristalográficas	75
2.13 Herramientas bioinformáticas	79
3. Resultados y discusión	79

3.1 Selección de enzimas lipolíticas del genoma de <i>T. thermophilus</i> HB27 para su clonación y expresión heteróloga	79
3.2 Esterasa de <i>T. thermophilus</i> HB27	81
3.3 Lipasa putativa de <i>T. thermophilus</i> HB27	109
3.4 Genoteca de <i>T. thermophilus</i> HB27 en pCC1FOS	112
4. Conclusiones	116
5. Referencias	117

1. Introducción

1.1 El género *Thermus* y sus enzimas de interés

El género *Thermus*, perteneciente al dominio bacteria y al phylum *Deinococcus-Thermus*, es uno de los más extendidos dentro de las bacterias termófilas (Cava *et al.*, 2009). Engloba una serie de especies caracterizadas por habitar en ecosistemas con temperaturas altas extremas. Se han aislado cientos de cepas de este género a partir de ambientes naturales, como fuentes hidrotermales marinas o terrestres, y también de ambientes con contaminación térmica o creados por el hombre, como sistemas de calefacción industriales o pilas de compostaje (Pantazaki *et al.*, 2002; Cava *et al.*, 2009); y en los últimos años se han seguido descubriendo nuevas especies (Kurosawa *et al.*, 2005; Bjornsdottir *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Vajna *et al.*, 2012; Ming *et al.*, 2014).

Los miembros de este género son bacterias Gram negativas termófilas, que se caracterizan por crecer aeróbicamente con altas tasas de crecimiento y buenos rendimientos celulares en medios complejos, a temperaturas óptimas entre 62 y 75°C. Además no requieren aminoácidos o vitaminas específicos (Cava *et al.*, 2009).

Existen numerosas enzimas procedentes de este género consideradas de gran potencial biotecnológico, y muchas de ellas ya están siendo explotadas en aplicaciones en investigación y en la industria, por ejemplo, una gran variedad de ADN polimerasas comerciales procedentes de distintas especies del género *Thermus*. El caso más destacable es de la Taq polimerasa de *Thermus aquaticus*, la primera enzima termoestable que se aplicó a la técnica de la PCR, pero también se comercializan las de las especies *Thermus filiformis*, *Thermus flavus*, *Thermus thermophilus* y *Thermus Brockianus*, entre otras (Terpe, 2013), cada una de ellas con distintas características que las hacen más adecuadas para diferentes aplicaciones. En los últimos años han aumentado notablemente las patentes relacionadas con el género *Thermus*, muchas de ellas relacionadas con ADN polimerasas, pero la variedad en funciones y aplicaciones industriales y biotecnológicas del resto de las enzimas es muy amplia (Cava *et al.*, 2009). Además, no sólo suscitan interés sus enzimas, sino que también son productores de metabolitos como los ramnolípidos, considerados los mejores biosurfactantes en numerosas aplicaciones en biorremediación y biomédicas (Rezanka *et al.*, 2011).

Otro aspecto a destacar es que las especies de *Thermus* constituyen una herramienta de gran utilidad en la sobreexpresión de proteínas termófilas y en la selección de mutantes termoestables de enzimas mesófilas por evolución dirigida (Cava *et al.*, 2009).

1.2 La especie *T. thermophilus*.

T. thermophilus es una especie de especial interés dentro de su género. Es un bacilo Gram negativo, con pigmentos amarillentos y carente de motilidad, aislado por primera vez de un manantial termal en Japón (Oshima & Imahori, 1974). Tiene una temperatura óptima de crecimiento de 65-72°C, siendo el máximo 85 y el mínimo 47°C. Esta especie se localiza en aguas termales con pH neutro o alcalino (Pantazaki *et al.*, 2002). Algunas de estas localizaciones son marinas, por lo que ciertas cepas son también halotolerantes (Martínsson *et al.*, 1999).

Existen dos cepas cuyo genoma ha sido secuenciado y está disponible públicamente, HB8 y HB27 (Henne *et al.*, 2004). Ambas poseen un genoma con alto contenido en bases G/C (69 %) y una alta densidad de codificación (95%) (Cava *et al.*, 2009).

T. thermophilus produce numerosas enzimas de gran interés biotecnológico e industrial. Entre ellas se incluyen una glucosa isomerasa, una xilosa isomerasa, proteasas, una beta-glucosidasa, una L-asparaginasa, al menos cuatro fosfatasas, una pirofosfatasa, y numerosas enzimas procesadoras del ADN y del ARN (Pantazaki *et al.*, 2002) (Tabla 3). Y también produce otras enzimas con aplicaciones prometedoras en diversos ámbitos como NADH oxidasas, que pueden participar en sistemas de reciclaje del cofactor acopladas a otras biotransformaciones (Rocha-Martín *et al.*, 2011); una manosa-6-P isomerasa que produce L-ribosa, un azúcar que no se encuentra en la naturaleza y que sirve como intermediario en la producción de fármacos antivirales y anticancerígenos (Hu *et al.*, 2011); o superóxido dismutasas que se emplean como agentes antioxidantes en distintas industrias (médica, cosmética, química, alimentaria y en agricultura) (Liu *et al.*, 2011), entre otras.

Tabla 3: Enzimas relevantes de *T. thermophilus* y sus aplicaciones.

Enzimas	Aplicaciones
Xilosa isomerasa	Obtención del azúcar xilulosa a partir de madera, para la producción de etanol.
Proteasas	Industria alimentaria, aditivos en detergentes.
L-Asparaginasa	Agente quimioterapéutico.
Fosfatasas	Aplicaciones en medicina clínica y biología molecular.
Pirofosfatasa	Disponible comercialmente para distintas aplicaciones como PCR, RT/PCR y secuenciación de ADN.
Enzimas procesadoras de ADN	Distintos tipos de enzima con numerosas aplicaciones: ADN polimerasas, ADN ligasas, ADN helicasas o nucleasas.
Reverso transcriptasa	Síntesis de ADNc a partir de ARNm.

1.3 Enzimas lipolíticas de *T. thermophilus* HB27.

Hace años que existen datos sobre la presencia de enzimas lipolíticas en especies del género *Thermus* (Berger *et al.*, 1995), pero no existían datos cuantitativos de su

producción hasta que se determinó en cuatro cepas de dicho género (Domínguez *et al.*, 2004). En este estudio se identificaron dos cepas con mayor producción global, *T. aquaticus* YT-1 y *T. thermophilus* HB27. Además, es muy frecuente que la actividad lipolítica de los termófilos esté confinada en el interior de la célula o, si es extracelular, que se exprese en niveles muy bajos, pero estas cepas mostraron una producción significativa a nivel extracelular (Domínguez *et al.*, 2004).

Se estudiaron las enzimas lipolíticas presentes en los extractos proteicos de dichas cepas que resultaron ser altamente termoestables, manteniendo un 75-100 % de actividad tras 30 min de incubación a 80°C, con una preferencia significativa por p-nitrofenil ésteres de ácidos grasos con cadenas laterales de longitud media (Domínguez *et al.*, 2004). Mediante análisis por zimografía se detectó la presencia de dos enzimas de distinto tamaño, 32 y 64 kDa, como responsables de la actividad lipolítica. Ambas estaban presentes en las fracciones intra- y extracelular, siendo la de 32 kDa mayoritaria (Fuciños *et al.*, 2005).

Las enzimas lipolíticas de la cepa *T. aquaticus* YT-1 fueron estudiadas para analizar su potencial para degradar plásticos (López *et al.*, 2011), y se realizaron experimentos para la optimización y escalado de su producción (Domínguez *et al.*, 2007; López *et al.*, 2012).

En el caso de las enzimas lipolíticas de la cepa *T. thermophilus* HB27, con el objetivo de mejorar el crecimiento y/o favorecer la secreción de dicha enzimas, se estudió la composición del medio (fuentes de carbono, adición de lípidos inductores y composición mineral) así como las condiciones de cultivo (pH, temperatura y aireación) tanto en matraces agitados como en biorreactores (Domínguez *et al.*, 2005; Domínguez *et al.*, 2007; Deive *et al.*, 2009a; Domínguez *et al.*, 2010). Se observó un efecto positivo en la producción de enzimas lipolíticas mediante el empleo de disacáridos como fuente de carbono, la adición de aceite de oliva (Domínguez *et al.*, 2007) y de aceite de girasol (Deive *et al.*, 2009b) al medio de cultivo y la sustitución del agua bidestilada con que se prepara el medio de cultivo por aguas termales naturales de determinados manantiales (Fuciños *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de optimización, el crecimiento celular seguía siendo relativamente bajo, y la actividad lipolítica permanecía retenida, en su mayoría, en la biomasa. La adición de surfactantes al medio de cultivo al final de la fase exponencial de crecimiento estimuló la secreción de la mayor parte de la enzima producida (Deive *et al.*, 2009b).

Las enzimas de 34 y 62 kDa de *T. thermophilus* HB27 fueron parcialmente purificadas y se caracterizó el extracto enzimático. Mostraron una actividad óptima a pH alcalino y a una temperatura de 80°C (Fuciños *et al.*, 2005). Posteriormente la enzima de 34 kDa fue purificada y caracterizada. La enzima purificada mostró una preferencia por ésteres de longitud de cadena media y una elevada termoalcalofilia (actividad óptima a pH 8.5 y temperaturas superiores a 80°C), con una marcada termoestabilidad (vida media de 135 minutos a 85°C). Fue identificada por MALDI-TOF-MS como la proteína YP_004875 en

las bases de datos del NCBI, anotada como una putativa esterasa en el genoma de *T. thermophilus* HB27 (Fuciños *et al.*, 2011a).

Tal y como se ha explicado en la introducción general, la expresión de enzimas termófilas en hospedadores mesófilos, capaces de llevar a cabo una secreción eficaz al medio de cultivo de proteínas heterólogas, reduce los costes de producción y simplifica el procesamiento posterior en casos como éste, y será uno de los objetivos de este capítulo.

1.4 Cristalización de proteínas termófilas

1.4.1 Cristalografía de Rayos X

La difracción de Rayos X sobre cristales de proteína es una de las técnicas de biología estructural que permite determinar la estructura de proteínas de alto peso molecular a nivel atómico. La información que puede proporcionar en el campo de las proteínas termófilas puede ser de gran importancia para entender las bases estructurales de la termoestabilidad, y puede aplicarse en el diseño racional de proteínas termoestables y/o en la interpretación de los resultados de evolución dirigida.

La base por la que se puede explicar como podemos “ver” la estructura de una proteína es similar a la que se emplea en microscopía óptica o electrónica. Para distinguir entre dos puntos de un objeto se necesita una radiación con una longitud de onda comparable a la distancia entre dichos puntos. El límite de resolución de un microscopio óptico es 0.2 μm , determinado por la longitud de onda de la luz visible, mientras que en un microscopio electrónica es 0.003 μm , debido a la menor longitud de onda de los electrones. Una macromolécula, como es una proteína, está compuesta por átomos que están unidos por enlaces de una longitud media de 1.5 Å. Por tanto, los Rayos X, producidos en laboratorios, con una longitud de onda entre 1-3 Å, son la radiación adecuada para este nivel de resolución (McPherson, 2009).

Esta técnica consiste en el análisis de los patrones de difracción obtenidos al dirigir un haz monocromático de Rayos X sobre un cristal puro de proteína de modo que los rayos son dispersados por los electrones de cada átomo. La dispersión producida por una única molécula proteica es imposible de detectar, por lo que es imprescindible el empleo de cristales de proteína pura donde la dispersión de los átomos de cada molécula, ordenados de manera repetitiva a lo largo de la estructura cristalina, es cooperativa y consigue amplificar la señal permitiendo la detección de los patrones de difracción (McPherson, 2009). Los patrones de difracción obtenidos al irradiar los cristales desde distintas orientaciones son recogidos y procesados mediante distintos métodos aplicando complicados algoritmos para obtener las coordenadas estructurales de los átomos que forman la molécula proteica.

El paso limitante para la aplicación de esta técnica es la obtención de cristales de proteína de buena calidad, que permitan la obtención de patrones de difracción de alta calidad y resolución. Un cristal de proteína es un sólido ordenado en el que se repite, en tres dimensiones, una unidad organizativa básica denominada celdilla, formando la red cristalina (Gómez-Moreno *et al.*, 2003). Esta celdilla puede estar formada por una o más moléculas de proteína. Los cristales de proteína tienen un contenido en agua de aproximadamente el 50% y los contactos entre moléculas de proteína son escasos y débiles, de modo que estos cristales son frágiles y sensibles a los cambios en su entorno.

El uso de sistemas de sobreexpresión de proteínas y fusión a péptidos etiqueta que permitan su purificación de manera sencilla, facilita la obtención de grandes cantidades de proteína, necesarias para realizar estudios de cristalografía.

1.4.2 Estructural tridimensional de la esterasa de 34 kDa de *T. thermophilus* HB27

La esterasa de 34 kDa de *T. thermophilus* HB27 no presenta homología con ninguna lipasa o esterasa microbiana conocida, y se ha publicado un modelo de su estructura tridimensional obtenido por medio de métodos de “threading” (Fuciños *et al.*, 2011a). Ante la ausencia de datos estructurales empíricos, en este trabajo se ha realizado una aproximación a la cristalización de la esterasa para abrir el camino hacia la obtención de cristales de proteína de alta calidad y que en un futuro se pueda resolver la estructura de la proteína por medio de cristalografía de Rayos X. Las proteínas son muy sensibles a su ambiente y pueden desnaturalizarse o degradarse impidiendo la formación de cristales. Por fortuna, se considera que las proteínas termófilas como las que nos ocupan en este capítulo son, en general, más fáciles de cristalizar que las mesófilas debido a su mayor estabilidad y rigidez (Cava *et al.*, 2009).

1.5 Resumen de los objetivos de este capítulo

Los experimentos englobados en este capítulo están dirigidos a realizar una búsqueda de nuevas enzimas lipolíticas termófilas de *T. thermophilus* HB27, siguiendo dos estrategias distintas, así como la expresión heteróloga y la caracterización bioquímica de las enzimas seleccionadas.

La primera de estas estrategias consiste en la búsqueda de enzimas lipolíticas en el genoma secuenciado de *T. thermophilus* HB27 (*genome mining*). Se llevará a cabo la clonación del gen que codifica la secuencia de la esterasa de 34 kDa de *T. thermophilus* HB27 (TTE), así como de un gen de una putativa lipasa seleccionado de su genoma (TTL), en el plásmido multicopia YEpFLAG-1, empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 como hospedador de expresión. También se caracterizará la actividad de las enzimas, y en el caso de la esterasa de 34 kDa, comparándola con la enzima nativa. Por último, también se realizarán experimentos de cristalización preliminar de la enzima recombinante TTE.

La segunda estrategia consiste en una búsqueda funcional, a través de la contrucción de una genoteca de *T. thermophilus* HB27 con el fósido pCC1FOS en *E. coli* EPI300™. Tras la detección de clones positivos se identificarán los genes responsables de dicha actividad.

2. Materiales y métodos

2.1 Material biológico

2.1.1 Cepas de bacterias y levaduras

En la Tabla 4 se recogen los detalles de las cepas bacterianas y de levaduras que han sido empleadas para llevar a cabo este trabajo junto con su genotipo y la finalidad con la que se han utilizado.

Tabla 4: Características de las cepas microbianas utilizadas en este trabajo.

CEPAS DE BACTERIAS			
Cepa	Genotipo	Aplicación	Procedencia
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	Silvestre, ATCCBAA- 163,DMS 7039	Fuente de ADN genómico	Proporcionada por el Doctor J. Berenguer (Universidad Autónoma de Madrid, España)
<i>E. coli</i> DH10b	<i>F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ-</i>	Mantenimiento y propagación de plásmidos	Invitrogen
<i>E. coli</i> ECOS™ Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsaR17 supE44 reiA1 lac [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (TetR)]</i>	Mantenimiento y propagación de plásmidos recombinantes	Yeastern
<i>E. coli</i> EPI300™-T1R Phage T1-resistant	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) (StrR) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG trfA tonA dhfr</i>	Construcción de la genoteca	Epicentre
CEPAS DE LEVADURAS			
<i>S. cerevisiae</i> BJ3505	<i>pep4::HIS3 prb-Δ1.6R HIS3 lys2-208 trp1- Δ101 ura3-52 gal2 can1</i>	Hospedador de expresión	Eastman Kodak Company

2.1.2 Vectores

En la Tabla 5 se recogen los distintos vectores que se han empleado para la realización de este trabajo junto con sus características y la finalidad de cada uno.

Tabla 5: Vectores empleados en este trabajo.

Vector	Tipo	Uso	Marcadores	Procedencia
YEpFLAG-1	<i>Plásmido episomal multicopia</i>	Clonación y expresión de TTE y TTL en <i>S. cerevisiae</i>	TRP y amp ^r	Eastman Kodak Company
pCC1FOS	Fósmido	Construcción de la genoteca	Chl ^R	Epicentre

2.1.3 Oligonucleótidos

En la Tabla 6 se recogen los oligonucleótidos que han sido empleados en este trabajo, especificando la aplicación y los detalles de sus secuencias. Los oligonucleótidos empleados como cebadores para la amplificación por PCR de los genes a clonar en el plásmido YEpFLAG-1 están diseñados a partir de la secuencia proporcionada por el GenBank de los genes que codifican la esterasa (GeneID: 2775484) y la lipasa putativa (GeneID: 2774632), añadiendo colas en los extremos, con la secuencia de las regiones adyacentes al sitio de clonación múltiple del vector YEpFLAG-1, lo que permitirá su posterior inserción en el mismo por recombinación homóloga.

Tabla 6: Secuencia de los cebadores empleados en PCR, mutagénesis dirigida y secuenciación, y características de los fragmentos amplificados (cebadores suministrados por TIB MOLBIOL).

Gen	Tipo y secuencia de cada cebador	Finalidad
TTE*	Directo: 5'-AGAGACTACAAGGATGACGATGACAAG CTCTTCCCCGGGAGGTCCTC-3' Inverso: 5'-GACGCTCGACGGATCAGCGGCCGCTTA TCTCGTCACACCCCTCGAGG-3'	Amplificación del gen de la esterasa a partir del codón 17 (eliminando la señal de secreción nativa).
TTL*	Directo: 5'-AGAGACTACAAGGATGACGATGACAAG CTCTTCCCCGGGAGGTCCTC 3' Inverso: 5'-TGGGACGCTCGACGGATCAGCGGCCGCTTA GAGTAGCCCAAGGACCTCGAG 3'	Amplificación del gen de la lipasa putativa.
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	Secuenciación del extremo 5' de los insertos clonados en pCC1FOS.
pCC1FOS Reverse Sequencing Primer	5' CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC 3'	Secuenciación del extremo 3' de los insertos clonados en pCC1FOS.
TTEASN1	Directo: 5' GAGTACGTCTTCCGCCAACACACGAACCCGGAG 3' Inverso: 5' CTCGGGTTTCGTGTGTGGCGGAAGACGTACTC 3'	Mutagénesis de la primera diana de glicosilación de TTE
TTEASN2	Directo: 5' CCGGCCTCGGAGGCCAATACACCTACTACCTC 3' Inverso: 5' GAGGTAGTAGGTGATTGGGCCTCCGAGGCCGG 3'	Mutagénesis de la segunda diana de glicosilación de TTE

* La secuencia subrayada es complementaria a la región adyacente al sitio de clonación múltiple del vector YEpFLAG-1.

2.2 Métodos microbiológicos

2.2.1 Mantenimiento de las cepas

La cepa hospedadora *S. cerevisiae* BJ3505 se mantuvo mediante resiembras periódicas en placas con medio YPD. Tras sembrar se incubó 24 h a 30°C y se almacenó a 4°C hasta un máximo de 2 meses.

Para su mantenimiento, las levaduras transformadas se resembraron periódicamente en placas con medio selectivo CM-trp para los transformantes de *S. cerevisiae* BJ3505. Tras sembrar se incubaron 48 h a 30°C y se guardaron a 4°C durante un máximo de 2 meses. Para la conservación a largo plazo, se guardaron a -80°C alícuotas de células frescas crecidas hasta saturación en medio selectivo CM-trp, mezcladas con glicerol estéril como crioprotector a una concentración final del 50 %.

Para el mantenimiento de cepas bacterianas transformadas, se resembraron cada mes en placas con medio de cultivo selectivo LBA, se incubaron 24 h a 37°C y se guardaron a 4°C. Para la conservación a largo plazo, se guardaron a -80°C alícuotas de células frescas crecidas hasta saturación en medio selectivo, mezcladas con glicerol estéril como crioprotector a una concentración final del 20 %.

La cepa de *Thermus thermophilus* HB27 se almacenó en forma de sedimentos celulares a -20°C, que servían como inóculos para posteriores cultivos y para propagar la propia cepa, para lo que se hizo crecer a 65°C en LB-glucosa bajo agitación continua de 30 r.p.m. durante unas 24 h. Posteriormente las células se recogieron por centrifugación y se les retiró exhaustivamente el medio de cultivo obteniendo los sedimentos compactos.

2.2.2 Medios de cultivo

A continuación se describe la composición y preparación de los medios de cultivo empleados para cultivar bacterias y levaduras. Los medios de cultivo líquidos se prepararon disolviendo los componentes en agua destilada. Para los medios sólidos en placas *Petri* se agregó adicionalmente agar bacteriológico a una concentración del 1.5 % como agente solidificante. La esterilización se realizó en un autoclave durante 20 minutos a 121°C y 2 Ba de presión.

El medio YPD es un medio general que se empleó para el cultivo de levaduras. Su composición es la siguiente: bactopectona 2 %, extracto de levadura 1 %, glucosa 2 %. Es aconsejable autoclavar separadamente la glucosa para evitar el oscurecimiento del medio (por la reacción de Maillard, entre aminoácidos y glucosa) y promover un crecimiento óptimo.

El medio YPHSM (Eastman Kodak Company) es un medio de cultivo de alta estabilidad para expresión de proteínas de secreción en levaduras, diseñado para la expresión de los genes clonados en el plásmido YEpFLAG-1. La composición del medio de cultivo es la siguiente: glucosa 1 %, glicerol 3 %, extracto de levadura 1 % y peptona 8 %. Para preparar 50 mL de medio, se añaden 2.5 mL de una solución de glucosa al 20 % y 2.5 mL de glicerol al 60 %, autoclavados por separado, a 45 mL de medio base con la peptona y extracto de levadura.

El medio CM-trp es un medio completo sin triptófano. Se trata de un medio de cultivo selectivo que se empleó para el cultivo de levaduras transformadas con un plásmido portador del gen *TRP1*, que complementa la auxotrofia para el triptófano de la levadura hospedadora. Su composición se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7: Composición del medio CM-trp

CM-trp (1L)	
Glucosa	20 g
Mezcla de aminoácidos (200X)	5 mL
YNB*	67 mL
Aminoácidos: Adenina, Uracilo, Histidina, Leucina, Tirosina	40 mg(cada uno)
Mezcla de aminoácidos 200X (1L)	
Arginina, Metionina, Treonina	2 g (cada uno)
Isoleucina, Fenilalanina	12 g (cada uno)
Lisina	8 g
YNB (1L)	
Vitaminas 300X	50 mL
Sales traza 150X	100 mL
KH ₂ PO ₄	15 g
MgSO ₄	7.5 g
NaCl	1.5 g
CaCl ₂	1.5 g
Sulfato amónico**	75 g
Mezcla de vitaminas 300X (1L)	
Biotina	0.6 mg
Pantotenato cálcico	120 mg
Ácido fólico	0.6 mg
Inositol	600 mg
Niacina	120 mg
p-Aminobenzoico	60 mg
Piridoxina	120 mg
Riboflavina	60 mg
Tiamina	120 mg

*se añade por separado, después de autoclavar, a una temperatura de 60°C, en condiciones estériles.

**se añade una vez disueltos el resto de los componentes, para evitar que precipite.

El medio LB (Luria-Bertani) modificado con glucosa es un medio general que se empleó para el cultivo de bacterias. Su composición es la siguiente: bacto triptona 1 %, NaCl 1 %, extracto de levadura 0.5 %, glucosa 0.1 %. Se disuelven los componentes en agua destilada, se ajusta el pH a 7.0 y se autoclava.

El medio LBA es un medio de cultivo selectivo para bacterias portadoras de vectores con el marcador amp^r de resistencia a ampicilina, que codifica para la β -lactamasa, una enzima que es secretada al espacio periplásmico donde cataliza la hidrólisis del antibiótico y evita su toxicidad. Su composición es idéntica a la del medio LB pero suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$. La ampicilina está preparada con agua destilada en alícuotas de concentración 100 mg/mL, almacenadas a -20°C . Este antibiótico puede degradarse, por lo que debe ser añadido al medio de cultivo en el momento inmediatamente anterior a su uso. En el caso de cultivos en placas *Petri*, se añade una vez que se enfría el medio de cultivo por debajo de los 65°C y las placas solidificadas se guardan a 4°C en la oscuridad.

El medio LB-maltosa- MgSO_4 es un medio LB modificado que se empleó para hacer crecer la cepa *E. coli* EPI300-T1^R antes de ser infectada con fagos para la construcción de genotecas. Su composición es idéntica a la del medio LB pero suplementado con maltosa al 0.2 % y MgSO_4 10 mM. El receptor que emplean los fagos lambda para infectar las células de *E. coli* es un transportador de maltosa, de modo que las células empleadas como hospedadores para la librería metagenómica se hacen crecer en un medio con maltosa para inducir la expresión del gen *lamB*, que codifica para dicho transportador. El MgSO_4 por su parte, sirve para optimizar la adsorción de los fagos a la superficie del hospedador.

El medio LB-cloranfenicol es un medio selectivo que se empleó para el cultivo de bacterias portadoras de vectores con el marcador Chl^R de resistencia a cloranfenicol, que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa, una enzima intracelular que acetila el cloranfenicol impidiendo su unión a los ribosomas bacterianos. La composición es idéntica al medio LB pero suplementado con cloranfenicol a una concentración final de 12.5 $\mu\text{g/mL}$. El cloranfenicol está preparado disuelto en etanol en alícuotas a una concentración de 33 mg/mL. Este antibiótico es muy inestable, por lo que debe ser añadido al medio de cultivo en el momento inmediatamente anterior a su uso. En el caso de cultivos en placas *Petri*, se añade antes de usar las placas diluyendo la cantidad necesaria de antibiótico para una placa de 20 mL en unos 100 μL de medio LB y extendiéndolo por la superficie de la placa con perlas de vidrio de 4 mm de diámetro.

El medio LB-tributirina se empleó para la detección de la actividad lipolítica. Este medio de cultivo se utilizó sólido en placas *Petri*, donde tiene un aspecto opaco blanquecino. Cuando se hace crecer una cepa productora de enzimas lipolíticas sobre este medio, las enzimas hidrolizan la tributirina emulsificada dando lugar a halos transparentes de hidrólisis alrededor de las colonias. La composición del medio de cultivo es la siguiente:

0.5 % peptona, 0.3 % extracto de levadura, 1 % goma arábica, y 1 % tributirina (Glogauer *et al.*, 2011). La goma arábica se añade para estabilizar la emulsión. Se mezclan los ingredientes con agua destilada y se emulsionan en una batidora de vaso a máxima potencia en intervalos de 1 min, separados por 2 min de descanso para que no se caliente el aparato, hasta alcanzar los 5 min de tiempo de emulsionado. Se ajusta el pH del medio a 7.4, se añade el agar y se autoclava inmediatamente. Una vez autoclavado se deja enfriar y se vierte en las placas Petri. A estas placas se les añadió el antibiótico apropiado según los vectores que posea la cepa que se vaya a sembrar en el momento de su utilización.

El medio SOC es un medio rico para el crecimiento de bacterias, que aumenta la eficiencia de la transformación de las células competentes. La composición del medio de cultivo es la siguiente: 2 % triptona, 0.5 % extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucosa.

2.2.3 Condiciones de cultivo en medio líquido.

Cultivos en tubos de vidrio. Para comprobar la expresión de las proteínas recombinantes en los candidatos transformados de *S. cerevisiae*, así como para la caracterización bioquímica en el caso de la esterasa recombinante, se realizaron cultivos líquidos en tubos de vidrio de 50 mL, conteniendo 2 mL de medio YPHSM. Estos cultivos, inoculados directamente con una pequeña cantidad de células procedente de una siembra en placa, se incubaron a 30°C durante 72 h bajo agitación orbital continua de 250 r.p.m. Al finalizar el cultivo, las células se separaron del medio extracelular por centrifugación a 13000 r.p.m. durante 2 min, y se empleó el sobrenadante como extracto proteico para medir actividad lipolítica.

Cultivos para expresión de proteínas recombinantes. Para expresar las proteínas recombinantes se realizaron cultivos en matraces *Erlenmeyer* de 500-250 mL, con un volumen de YPHSM modificado correspondiente a la quinta parte de su capacidad. Los cultivos se inician añadiéndoles el volumen apropiado de preinóculo en el mismo medio para ajustar la DO₆₀₀ inicial a 0.1. Los cultivos se dejaron crecer a 30°C bajo agitación orbital continua de 250 r.p.m. durante 72 h.

Cultivos para purificación de proteínas recombinantes. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las indicadas para la expresión de proteínas recombinantes, pero empleando 500 mL de medio de cultivo en matraces *Erlenmeyer* de 2 L. Los cultivos se dejaron crecer 72 h tras lo cual se procedió a la purificación de las proteínas recombinantes expresadas.

2.2.4 Estabilidad plasmídica

La estabilidad plasmídica en YPHSM de las levaduras transformadas Sc-EST3-O y Sc-LIP1-O fue determinada tomando muestras a diferentes tiempos de cultivo y sembrando 100 µL de la dilución adecuada para obtener colonias aisladas en placas de YPD. Tras dejarlas crecer a 30°C, se realizó una réplica de las mismas con paños de terciopelo estériles en placas de medio selectivo (CM-trp). Estas placas fueron incubadas a 30°C durante 24 h. Se estimó la proporción de colonias viables Trp⁺ que contenían el plásmido contando las colonias ausentes (sin plásmido) y presentes (con plásmido) en las placas de medio selectivo con respecto a las de medio no selectivo.

2.3 Técnicas de manipulación de ADN

2.3.1 Extracción de ADN genómico de *T. thermophilus* HB27

Se realizaron cultivos sumergidos de *T. thermophilus* HB27 en matraces *Erlenmeyer* de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio LB-glucosa. Los cultivos se inocularon (ratio volumétrico 1:1000) con pellets de células previamente obtenidos (almacenados a -20°C) y se incubaron en un baño a 65°C bajo una agitación de 30 r.p.m. durante 24 h. Las células de una alícuota de 1.5 mL de cultivo se recogieron por centrifugación (2 min, 11.400xg) y se emplearon para la extracción del ADN genómico mediante el método del CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Wilson, 2001). Este método, se caracteriza por eliminar proteínas y los lipopolisacáridos de las paredes celulares, los cuales precipitan con el CTAB, permitiendo la obtención de muestras de ADN muy puro y de alto peso molecular (Moore *et al.*, 1999).

El protocolo de extracción comenzó con la resuspensión de las células en 567 µL de tampón TE (Tris/HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM pH 8). La lisis de las células se debe realizar a pH básico ya que reduce las interacciones electrostáticas entre el ADN y las proteínas básicas, promueve la desnaturalización de otras proteínas celulares e inhibe la actividad nucleasa. El EDTA se une a cationes divalentes, particularmente Mg⁺² y Mn⁺², reduciendo la estabilidad de las paredes y membranas y también inhibiendo la actividad nucleasa que requiere cationes metálicos.

Se añadieron 30 µL de SDS al 10 % y 3 µL de una solución de proteinasa K (*Sigma*) 20 mg/mL, se mezcló y se incubó durante 1 hora a 37°C. La Proteinasa K es una serín proteasa que hidroliza enlaces de la pared de peptidoglicano. El SDS es un detergente aniónico que reacciona, a bajas concentraciones, con los sitios hidrofóbicos de las proteínas, uniéndose a proteínas celulares y lipoproteínas, formando complejos micelares SDS-polipéptidos, desnaturalizándolas y promoviendo su disociación de los ácidos nucleicos.

Se añadieron 100 μ L de una solución NaCl 5 M, se mezcló generosamente, y a continuación 80 μ L de la solución CTAB/NaCl y se incubó la mezcla a 65°C durante 10 min. El CTAB es un detergente catiónico que sirve para eliminar los polisacáridos de las paredes celulares y proteínas. La presencia del ión Na⁺ a concentraciones superiores a 0.5 M es necesaria para que el ADN permanezca soluble.

La extracción de ADN de la suspensión se realizó mediante la adición de 780 μ L de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), que se mezcló y se centrifugó durante 5 minutos. Se retiró la interfase con un palillo y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y se volvió a centrifugar 5 min. Se retiró la interfase con un palillo y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Los solventes orgánicos empleados interaccionan con los componentes hidrofóbicos de las proteínas y lipoproteínas, provocando su desnaturalización. El precipitado de material celular desnaturalizado permanece en la fase orgánica, que se separa por centrifugación. El fenol es más efectivo para desnaturalizar proteínas, mientras que el cloroformo lo es para eliminar material polisacárido. La función del alcohol isoamílico es estabilizar la interfase entre las fases acuosa y orgánica, actúa como antiespumante.

Para la recuperación del ADN se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol y se mezcló suavemente hasta que el ADN precipitó. El precipitado fue centrifugado y lavado con 1 mL de etanol al 70%, y centrifugado de nuevo. El sobrenadante se descartó, el ADN precipitado se secó ligeramente al vacío y se resuspendió en 50 μ L de agua bidestilada estéril.

Para la preparación de la disolución CTAB/NaCl (CTAB 10 %/ NaCl 0.7 M) se disuelven 4.1 g de NaCl en 80 mL de H₂O y se añaden 10 g de CTAB lentamente mientras se agita bajo calefacción hasta un máximo de 65°C. El volumen final se ajusta a 100 mL.

2.3.2 Amplificación de los genes por PCR

Los genes seleccionados que codifican para las enzimas lipolíticas de *T. thermophilus* HB27 se amplificaron por PCR a partir del ADN genómico con los cebadores indicados en la tabla 6.

Las condiciones en las que se realiza la PCR han sido adaptadas para mejorar el rendimiento de la amplificación de estos genes, en función de su alto contenido en pares C+G, por lo que se emplearon altas temperaturas de anillamiento y se añadió DMSO a una concentración final del 4% a la mezcla de reacción para mejorar la especificidad y rendimiento del producto amplificado.

Para la amplificación de los genes de la esterasa y la lipasa se empleó la *Taq* ADN polimerasa (Roche). Para una mezcla de PCR de 100 μ L empleamos 1 μ L de ADN

genómico de *T. thermophilus* HB27, 10 µL de tampón de reacción 10X (*Roche*), 8 µL de la mezcla de dNTPs (2.5 mM cada uno), 6 µL de cada cebador (20 µM), 4 µL de Taq ADN polimerasa de *Roche* (5 U/µL), 4 µL de DMSO y agua bidestilada hasta completar los 100 µL. La PCR se desarrolló siguiendo el siguiente programa térmico: desnaturalización inicial (95°C, 3min); seguido de 30 ciclos de desnaturalización (95°C 30 seg), anillamiento (55°C, 30seg) y extensión (72°C, 1 min); y un paso final de 72°C durante 8 min.

2.3.3 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones del ADN con endonucleasas de restricción (de las casas comerciales: *Roche*, *Takara* y *Fermentas*) se realizaron empleando los tampones comerciales suministrados con las mismas y a la temperatura recomendada por el proveedor, 37°C. Para digerir 1-2 µg de ADN, se utilizaron 5-10 unidades enzimáticas por cada µg de ADN en un volumen final de 20-30 µL, con un tiempo de digestión de 2-3 h.

2.3.4 Extracción de ADN plasmídico

Las extracciones del ADN plasmídico se realizaron usando un kit comercial, *Spin Clean™ Plasmid Miniprep Kit* de Metabion o *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* de Thermo scientific, con el que se obtiene un ADN de gran pureza libre de ARN. Ambos se basan en los mismos principios para la purificación del ADN y tienen protocolos prácticamente idénticos, por lo que sólo se muestra el del segundo.

Para extraer plásmidos de bacterias se emplearon células crecidas en placa con medio selectivo (LBA) durante toda la noche a 37°C. Se recogieron las células de ½ o ¼ de placa con un palillo estéril y se resuspendieron en 250 µL de tampón de resuspensión con ayuda de un vórtex.

Se añadieron 250 µL de tampón de lisis para romper las células por lisis alcalina con SDS, y se invirtió el tubo 4-6 veces. Esta solución también promueve la desnaturalización del ADN. Se neutralizó la solución con 300 µL de solución de neutralización y se invirtió el tubo 4-6 veces. En estas condiciones el ADN genómico que pudiera contaminar la muestra se aparea desordenadamente, formando agregados insolubles que precipitan, mientras que el ADN plasmídico, gracias a su estructura circular, rehibrida y permanece soluble. Las proteínas y el SDS con sales también son insolubles, agregan y precipitan favoreciendo la precipitación de ADN cromosómico. Se centrifugó el lisado celular 5 min a 13000 r.p.m. en una microcentrífuga para separar el precipitado y se procedió a purificar el plásmido transfiriendo el sobrenadante a una columna de purificación proporcionada por el kit. Esta columna contiene gel de sílice, al que se une el ADN gracias a la presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas. Se centrifugó 1 minuto a 13000 r.p.m. Se añadieron 500 µL de solución de lavado que contiene etanol para eliminar sales y otros contaminantes. Se centrifugó 1 min a 12000 r.p.m. Para

recuperar el ADN se transfirió la columna a un tubo limpio, se añadieron 50 µL de H₂O bidestilada en el centro de la membrana y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 2 min a 13000 r.p.m. y se recogió el eluido con el ADN plasmídico.

Para la extracción de los plásmidos de levaduras se emplearon cultivos líquidos de medio selectivo (CM-trp) de 10 mL que se dejaron crecer toda la noche a 30°C bajo agitación orbital continua de 250 r.p.m. Las células de 10 mL se recogieron por centrifugación durante 3 min a 5000 r.p.m. Se resuspendieron en 500 µL de H₂O bidestilada, se pasaron a un tubo *Eppendorf* y se centrifugaron de nuevo 5 minutos a 3000 r.p.m. en una microcentrífuga. El procedimiento de extracción a partir del precipitado de células fue similar al de bacterias pero, tras añadir la solución de lisis, se requirió una rotura mecánica adicional con perlas de vidrio de 425-600 µm de diámetro durante 2 min en el vórtex, seguido de 5 min de incubación a 4°C. Y tras la adición de la solución de neutralización el tubo se incubó en hielo durante 5 min.

2.3.5 Extracción de fósidos

La extracciones de fósidos recombinantes se realizaron empleando el kit comercial *FosmidMAX™ DNA Purification Kit* (Epicentre) a partir de 1.5 mL de cultivo. El método que emplea este kit se basa en la lisis alcalina de las células y la purificación del ADN por precipitación selectiva. El ARN de la muestra se emplea como agente que facilita la precipitación del ADN y permite la visualización del precipitado, siendo eliminado al final de la extracción.

El fósido pCC1FOS es un fósido de copia única que debe ser inducido a multicopia previamente a la extracción. Para ello se realizaron cultivos de 2 mL de medio LB-cloranfenicol suplementados con 4 µL de la solución de inducción proporcionada por el kit (500X *CopyControl Fosmid Autoinduction*). Los cultivos se inocularon con una pequeña porción de células de un cultivo fresco en placa, y se dejaron crecer por la noche a 37°C durante 16-20 h bajo agitación orbital continua a 250 r.p.m.

Las células de 1.5 mL de cultivo se recogieron por centrifugación en una microcentrífuga 3 min a 13000 r.p.m. y se resuspendieron en 200 µL de tampón de resuspensión frío (*FosmidMAX Solution 1*). Se añadieron 400 µL de *FosmidMAX Solution 2* y se mezcló por inversión del tubo 2-3 veces para llevar a cabo la lisis alcalina. Antes de 5 minutos se neutralizó la solución con 300 µL de solución de neutralización fría (*FosmidMax Solution 3*) y se mezcló por inversión 2-3 veces. Para impedir la fragmentación del ADN se debe evitar el pipeteo y mezcla enérgica o con vórtex de la solución durante estos pasos. Se incubó el tubo 15 min en hielo y se centrifugó a 20000xg durante 15 min a 4°C para eliminar el debris celular.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se precipitó el ADN con 540 µL de isopropanol, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente 15 min. Se precipitaron los

ácidos nucleicos por centrifugación a 20000xg, 15 min, 4°C. Se decantó el isopropanol, se centrifugó brevemente de nuevo y se eliminó el exceso de isopropanol. Se dejó secar el precipitado al aire y se resuspendió en 250 µL de tampón TE (suministrado por el kit) dando golpecitos al tubo. Se añadieron 250 µL de *FosmidMAX Solution 4*, se mezcló de nuevo dando golpecitos al tubo y se incubó en hielo durante 15 min. Se centrifugó 15 min a 20000xg y 4°C, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se añadió 1 mL de etanol frío al sobrenadante recuperado, y se mezcló por inversión 4-6 veces. Se precipitó el ADN por centrifugación a 20000xg, 15 min, 4°C, se eliminó el sobrenadante y al igual que con el isopropanol se volvió a centrifugar brevemente y se eliminaron los restos de etanol.

Se dejó secar el precipitado al aire y se resuspendió en 25 µL de agua bidestilada dándole golpecitos al tubo, y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió 1 µL de ARNasa (*RiboShredder Rnasa Blend*) al tubo y se incubó a 37°C durante 30 min.

2.3.6 Mutagénesis puntual

Para realizar mutaciones puntuales en la secuencia del gen de la esterasa clonado en el plásmido YE_pFLAG-1 se empleó el kit *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene). La mutagénesis consiste en una reacción de amplificación mediante PCR empleando el plásmido recombinante original como molde y unos cebadores que portan la mutación deseada. Los primers se diseñaron de acuerdo con la mutación deseada empleando el programa web recomendado por el manual: *Stratagene's web-based QuikChange® Primer Design Program* (disponible online en <http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>) y sus secuencias se recogen en la tabla 6.

El resultado de esta reacción de amplificación es un vector de doble cadena que presenta la mutación deseada, cuyas hebras circulares contienen *nicks* (entre cada cebador y el final de la secuencia amplificada). Estos plásmidos se transformaron en bacterias, las cuales repararon dichos *nicks* tras la transformación.

Para eliminar las dos dianas de glicosilación de la esterasa se llevaron a cabo dos reacciones de mutagénesis en las que se cambiaron los residuos de asparagina por glutaminas (ACC -> CAA) en los dos puntos de glicosilación predichos por NetNGlyc 1.0 Server. En primer lugar se mutó la primera y el vector mutado se transformó en *E. coli* ECOS Blue, se extrajeron los plásmidos y se confirmó por secuenciación la corrección de la secuencia. Empleando este plásmido mutante confirmado se realizó una segunda mutagénesis para modificar el residuo de asparagina de la segunda diana, se transformó en *E. coli* ECOS Blue y de nuevo la construcción fue confirmada por secuenciación. Por último, el vector con las dos mutaciones fue transformado en células de *S. cerevisiae* BJ3505 para la expresión y purificación de la esterasa mutante.

La mezcla de reacción de la PCR estaba compuesta por los siguientes componentes: 5 µL de tampón de reacción, 2 µL (25 ng) de ADN doble hebra del vector, 1 µL (125 ng) de cebador directo, 1 µL (125 ng) de cebador inverso, 1 µL de mezcla de dNTP y 40 µL de H₂O hasta un volumen final de 50 µL. Finalmente se añadió 1 µL de *PfuTurbo* ADN polimerasa (2.5 U/µL). El programa térmico empleado se ajustó siguiendo las indicaciones del manual, a una mutación de cambio de aminoácido. La PCR se desarrolló según el siguiente programa térmico: desnaturalización inicial (95°C, 30 seg); seguido de 16 ciclos de desnaturalización (95°C, 30 seg), anillamiento (55°C, 1 min) y extensión (68°C, 8 min).

Tras la reacción, se enfriaron los tubos de PCR hasta una temperatura menor de 37°C, se añadió 1 µL de la enzima de restricción *Dpn* I (10 U/µL), se mezcló generosamente pipeteando la solución varias veces, se centrifugó brevemente la mezcla para que el líquido bajara al fondo del tubo y se incubó inmediatamente cada reacción a 37°C durante 1 h. Esta endonucleasa es específica para el ADN metilado y hemimetilado, de modo que se usa para eliminar el ADN parental de la muestra y seleccionar únicamente aquel que lleva la mutación deseada.

2.4 Construcción de cepas recombinantes con YEpFLAG-1 en *S. cerevisiae* BJ3505

Los genes que codifican para las proteínas TTE y TTL se clonaron en el plásmido YEpFLAG-1 (Eastman Kodak Company) a continuación de la señal de secreción del factor α de la levadura, expresado bajo el control del promotor de levadura de la alcohol deshidrogenasa 2 (*ADH2*) y el terminador *CYC1*. Además el plásmido proporciona el péptido etiqueta FLAG en posición amino terminal a la proteína expresada, lo cual permite la detección inmunológica y la purificación mediante inmunoadfinidad de la proteína de fusión con FLAG.

2.4.1 Transformación de levaduras

Para la clonación, células de *S. cerevisiae* BJ3505 se cotransformaron por medio del método del acetato de litio (Ito *et al.*, 1983) con los productos de PCR de amplificar los genes de las enzimas lipolíticas seleccionadas (TTE y TTL) y con el plásmido YEpFLAG-1, previamente linearizado por digestión con *Eco* RI y *Sal* I (Takara). Este método está basado en el tratamiento de las células con sales de litio y PEG que favorecen la introducción del ADN en las mismas. La introducción de los genes amplificados en el plásmido se produce mediante recombinación homóloga entre las colas de los productos de PCR y los extremos del plásmido con los que presentan homología (Fig. 7).

Para realizar la transformación se inocularon 10 mL de medio YPD con la levadura *S. cerevisiae* BJ3505 que se dejó crecer toda la noche a 30°C bajo agitación orbital continua de 250 r.p.m. A la mañana siguiente se transfirieron 500 µL de cultivo a 10 mL de medio fresco, se dejó crecer en agitación a 30°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.8-1 y se

recogieron las células por centrifugación 3 min a 4000 r.p.m. El precipitado se resuspendió en 1 mL de 1xTE (preparado a partir de un *stock* de 10xTE que contiene Tris 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM). Se centrifugó 3 min a 4000 r.p.m. y el precipitado se resuspendió en el volumen adecuado de 1xLiAc/0.5xTE (solución preparada a partir del *stock* 10xTE y del *stock* 10xLiAc que es LiAc 1 M a pH 7.5), 100 µL por transformación. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Para cada tubo de transformación se añadieron 100 µL de la suspensión anterior junto con 5 µL de ADN de salmón sonificado a una concentración de 10 mg/mL (*carrier*) (*Sigma-Aldrich*) y un máximo de 30 µL de ADN transformante. Se añadieron 700 µL de 1xLiAc/40% PEG-3350/1xTE y se mezcló suavemente. Se incubó la mezcla 30 min a 30°C. A continuación se añadieron 88 µL de dimetil sulfóxido (DMSO), se mezcló bien y se incubaron las células a 42°C durante 7 min para provocarles un choque térmico. Finalmente, se centrifugaron las suspensiones celulares a 13000 r.p.m. durante 10 seg, se resuspendieron los sedimentos en 1 mL de medio de cultivo YPD y se dejaron incubando en agitación a 30°C durante 2 horas. Pasado ese tiempo, se volvieron a centrifugar y se eliminó el medio de cultivo excepto 100 µL en los cuales se resuspendieron las células.

La selección de los transformantes que contienen el plásmido recombinante se realizó mediante siembra en medio selectivo (CM-trp).

Los plásmidos recombinantes se extrajeron de las levaduras usando kits comerciales (apartado 2.3.4) y se propagaron en *E. coli* DH10B a fin de obtener ADN suficiente para comprobar la construcción por PCR, análisis de restricción y finalmente por secuenciación.

2.4.2 Preparación de células competentes de bacterias

Para poder introducir material genético en células bacterianas es necesario inducir en las células un estado de “competencia” transitorio, durante el cual son capaces de captar ADN, mediante el tratamiento con sales y posteriormente con calor durante la transformación, para permeabilizar la membrana.

Se inoculó con 40 µL de células DH10B o ECOS Blue competentes un precultivo en tubo de vidrio con 3 mL de LB-glucosa. Se dejó crecer toda la noche a 37 °C bajo agitación y se empleó para inocular 300 mL de medio SOC. Se dejaron crecer a 37°C bajo agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5-0.6 y se incubaron en hielo 10 min para detener la reproducción de las células. A continuación se recogieron las células centrifugando 5 min a 5.000 r.p.m. y 4°C. Las células se resuspendieron en 80 mL de la solución TBF-1 y se incubaron en hielo durante 5 min. Se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en 15 mL de la solución TBF-2. Por último, se repartieron en alícuotas de 100-500 µL que se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser utilizadas.

Para preparar las soluciones TBF-1 y TBF-2 se pesan los componentes que se indican a continuación para cada una de ellas, se disuelven en agua bidestilada y se esterilizan por filtración. Para 80 mL de TBF-1 se necesitan: 0.984 g CIRb, 0.788 g MnCl_2 , 0.232 g acetato de potasio, 0.115 g CaCl_2 , 12 mL glicerol. Para evitar la precipitación del MnCl_2 se añadió en último lugar, después de ajustar el pH de la solución a 5.8 con ácido acético. Para 15 mL de TBF-2 se necesitan: 0.02 g CIRb, 0.2 g CaCl_2 , 2.28 mL glicerol.

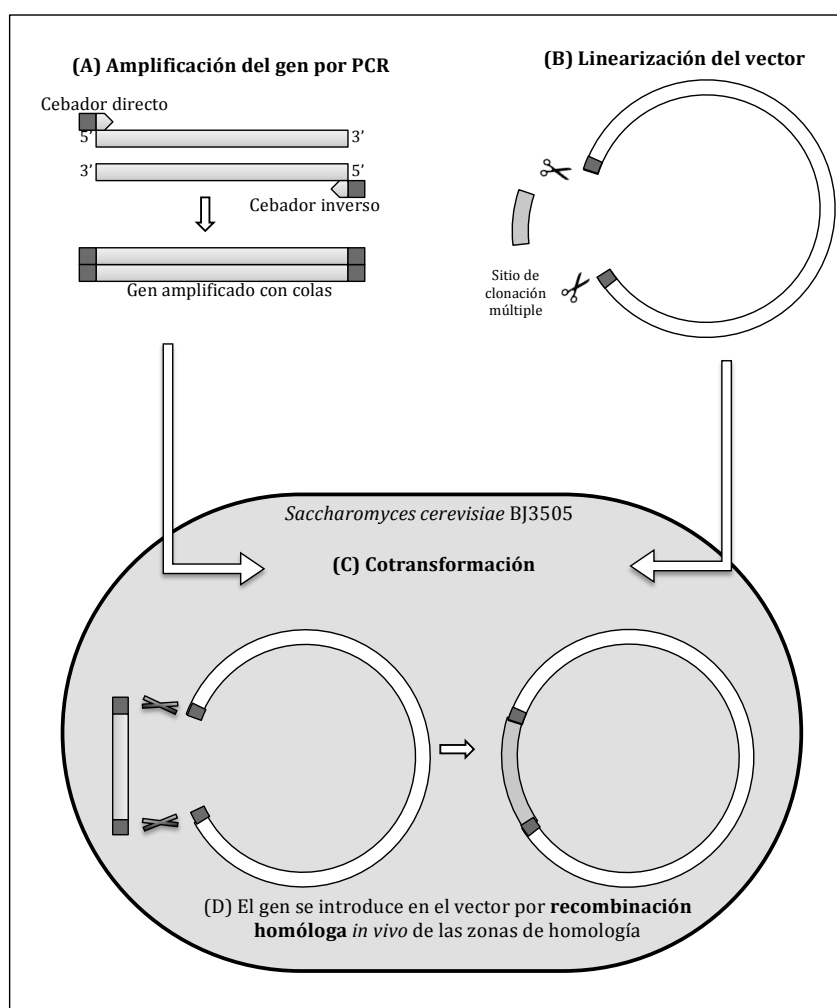


Figura 7: Esquema del proceso de cotransformación de la levadura por el método de acetato de litio (C) con el gen amplificado (A) y el vector linearizado (B), para la clonación mediante recombinación homóloga (D).

2.4.3 Transformación de bacterias

La transformación de las células competentes de *E. coli* se realizó a partir de 50 μL de células competentes recién descongeladas. Se mezclaron con el DNA plasmídico y se incubaron durante 20 min en hielo. A continuación se las sometió a un choque térmico a 42°C de 45 seg, seguido de 3 minutos de reposo en hielo, tras lo cual se añadieron 400 μL de medio de cultivo LB-glucosa. Para recuperar las células, se incubaron durante 30 min en agitación a 37°C antes de sembrarlas en placas con medio selectivo, LBA, para obtener colonias aisladas resistentes a ampicilina.

2.5 Construcción y búsqueda funcional en la genoteca de *T. thermophilus* HB27

En la Figura 8 se observa un esquema general de los pasos realizados para la construcción de una genoteca mediante el *CopyControl™ Fosmid library Production Kit* con el fósido pCC1FOS.

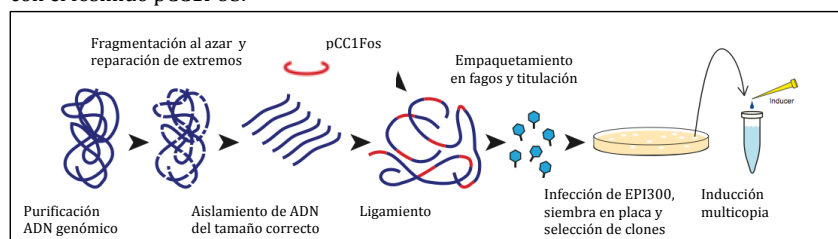


Figura 8: Pasos generales en la construcción de una genoteca con el fósido pCC1FOS de Epicentre. Imagen modificada del manual del kit.

En nuestro caso, para realizar una genoteca de *T. thermophilus* HB27 partimos de ADN genómico preparado por el método CTAB (apartado 2.3.1). Este método al ser enzimático, y no mecánico, nos permitió obtener ADN genómico de alto peso molecular, adecuado para su ligamiento en el fósido. De modo que los pasos de fragmentación de ADN y recuperación de los fragmentos del tamaño adecuado no fueron necesarios, y se procedió a realizar directamente la reparación de extremos y el ligamiento con el fósido pCC1FOS (Fig. 8).

2.5.1 Reparación de extremos y ligamiento

En primer lugar se repararon los extremos de los insertos de ADN genómico de *T. thermophilus* HB27, para generar extremos romos fosforilados en 5'. Se emplearon 11 μL de la extracción de genómico, con una concentración estimada de 183 ng/ μL (aproximadamente 2 μg). La mezcla de reacción (20 μL finales) contenía: 2 μL H₂O, 2 μL tampón 10X End-Repair, 2 μL 25 mM mezcla de dNTP, 2 μL ATP 10 mM, 1 μL enzima

End-Repair (componentes del kit). Se incubó el tubo de reacción 45 min a temperatura ambiente, y posteriormente 10 min a 70°C para inactivar la enzima.

En segundo lugar se llevó a cabo el ligamiento del ADN reparado con el fósido pCC1FOS, linearizado y desfosforilado, proporcionado en el kit. Se emplearon 2.5 µL de la reacción de reparación (aproximadamente 0.25 µg). La mezcla de reacción (10 µL) contenía: 3.5 µL H₂O, 1 µL tampón 10X Fast Link Ligation, 1 µL ATP 10 mM, 1 µL pCC1FOS (0.5 µg/ µL), 2.5 µL reacción end-repair (aprox 0.25 µg), 1 µL Fast Link DNA ligase (componentes del kit). Se incubó 4 h a temperatura ambiente, y posteriormente se inactivó la enzima 10 min a 70°C. El resultado de esta reacción es la obtención de largos tándems de fragmentos de ADN genómico intercalado con la secuencia del fósido.

2.5.2 Empaquetamiento en fagos

Con el kit se proporcionan tubos con 50 µL de una suspensión de fagos lambda (*MaxPlax Lambda Packaging Extracts*) para el empaquetamiento en fagos de cada genoteca, los cuales se mantienen almacenados a -80°C. Estos tubos contienen lisados de dos cepas de *E. coli* productoras de fago lambda cada uno de las cuales contienen mutaciones en distintas proteínas de la cápside que se complementan entre si:

- La primera cepa produce fagos con una mutación en el gen que codifica la proteína D de la cápside, y produce partículas de fagos vacías que se acumulan después de la inducción en bacterias (Hohn, 1979) (Fig. 9).
- En la segunda cepa la mutación afecta a la proteína principal de la cápside, la proteína E, y en su ausencia todas las otras proteínas de la cabeza están disponibles en forma soluble, de modo que se aporta la proteína D (Gunther, 1993) (Fig. 9).

Se descongeló un tubo de extracto de fagos lambda en hielo, y una vez descongelado se transfirieron inmediatamente 25 µL a un tubo eppendorf. Se guardó el remanente de nuevo a -80°C. Se añadieron los 10 µL de ligamiento a la suspensión de fagos, se mezcló por pipeteo sin introducir burbujas de aire, y se centrifugó brevemente el tubo para llevar todo el líquido al fondo. Se incubó el tubo a 30°C durante 2 horas. Una vez finalizada la incubación, se añadieron los restantes 25 µL de la suspensión de fagos y se incubó otras 2 h a 30°C. Al final de la incubación se añadió el tampón de dilución de fagos (Tris/Hcl 10 mM pH 8.3, NaCl 100mM, MgCl₂ 10 mM) hasta un volumen final de 500 µL y se mezcló generosamente. En los extractos está presente la enzima terminasa del fago lambda, que se encarga de cortar los tándems por los sitios *cos* que presenta el fósido y del empaquetamiento de los fragmentos resultantes en el interior de las cápsides del fago. Al final de este proceso cada fago posee un fragmento lineal de ADN con extremos cohesivos de 12 pb formados al cortar la secuencia en los sitios *cos*, que contiene ADN genómico y una copia del fósido. Este ADN recirculariza al introducirse en *E. coli* con la ligasa endógena de la propia bacteria.

Capítulo 1

Por último, se añadieron 25 μL de cloroformo para eliminar cualquier bacteria que pudiera estar presente, se mezcló y se guardó a 4°C.

La genoteca empaquetada en fagos puede permanecer a 4°C varios días, pero para su almacenamiento a largo plazo se añadió glicerol a una concentración final del 20% y se guardó a -80°C.

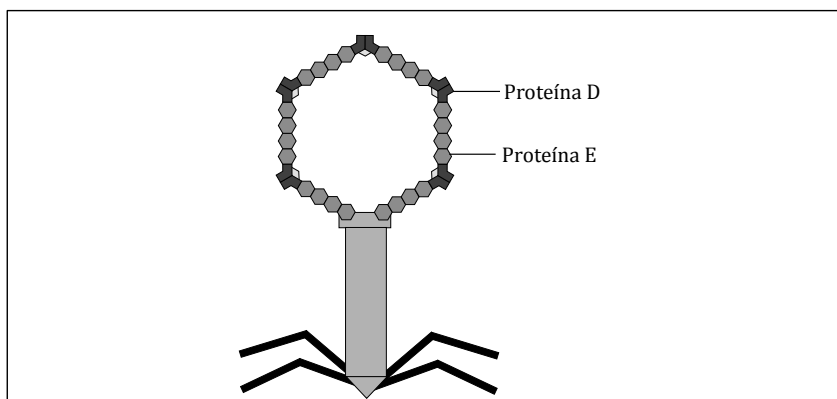


Figura 9: Representación esquemática de las proteínas del fago lambda, indicando la posición de las proteínas E y D de la cápside. Simplificación del modelo descrito por (Rajagopala *et al.*, 2011).

2.5.3 Preparación de células EPI300-T1^R

La cepa EPI300-T1^R se proporciona en un *stock* en glicerol y las células se deben preparar antes de ser empleadas para obtener la librería genómica. Para ello se sembró una placa LB y se dejaron crecer las células toda la noche. Se selló la placa con parafilm y se guardó a 4°C. El día anterior a la construcción de la genoteca se inocularon 50 mL de medio LB-maltosa con una única colonia de EPI300-T1^R y se dejó crecer toda la noche a 37°C, bajo agitación orbital continua de 250 r.p.m. Por la mañana se inoculó un cultivo de 50 mL de medio fresco con 0.5 mL, se dejó crecer hasta una DO_{600} de 0.8-1.0 y se guardó a 4°C, donde el cultivo puede permanecer hasta un máximo de 72 horas antes de ser empleado.

2.5.4 Titulación

La titulación de una genoteca en fagos nos permite determinar el número de clones que la constituyen. Así podemos saber la dilución y el número de placas de que necesitamos emplear en la infección, para obtener la genoteca del tamaño deseado en *E. coli*. Y también nos sirve para calcular la eficiencia de todo el proceso de construcción de la genoteca.

Para realizar la titulación se prepararon diluciones seriadas de la genoteca empaquetada en fagos (con tampón de dilución de fagos): 1:10, 1:100, 1:1000. Se añadieron 10 µL de cada dilución, y también de la suspensión de fagos sin diluir como control, a 100 µL de células EPI-300 preparadas para el empaquetamiento. Se incubó cada tubo a 37°C durante 1 h y se sembraron las células infectadas con perlas de vidrio de 4 mm de diámetro en placas LB suplementadas con cloranfenicol. Se dejaron crecer a 37°C toda la noche y se contaron el número de colonias que crecieron en cada placa.

2.5.5 Cálculo del número de clones necesarios

Antes de infectar nuestra genoteca en *E. coli* necesitamos conocer el número de clones que queremos obtener. Se puede calcular el número de clones que se necesitan para que todas las secuencias del genoma de *T. thermophilus* HB27 estén representadas en la genoteca. Este valor depende del tamaño del genoma, el tamaño del inserto y la certeza que deseemos.

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$$

Donde N es el número de clones de la librería; P es la probabilidad deseada, expresada como fracción, de que cualquier secuencia de ADN del genoma esté representada en la genoteca; y f es la proporción del genoma contenido en cada clon.

2.5.6 Producción de la genoteca: infección de EPI300-T1^R

Para obtener 1000 clones, aproximadamente, se mezclaron 100 µL de la genoteca empaquetada en fagos con 1 mL de células EPI300-T1^R preparadas, y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se sembraron las células infectadas en 10 placas de LB-cloranfenicol, extendiendo 110 µL de la mezcla de infección en cada una de ellas con bolas de vidrio. Se dejaron crecer a 37°C durante toda la noche, y posteriormente 6 h a 65°C. Las placas se guardaron a 4°C.

2.5.7 Búsqueda funcional

Las colonias se recogieron con palillos estériles y se resembraron de manera ordenada en placas con medio LB-cloranfenicol. Se dejaron crecer a 37°C toda la noche. Entonces se realizaron réplicas con paños de terciopelo en placas de LB-cloranfenicol, para guardar, y LB-cloranfenicol-tributirina para detectar la actividad lipolítica. Las primeras se dejaron crecer toda la noche y se guardaron a 4°C. Las segundas se incubaron a 37°C durante 2 días para la formación de halos de hidrólisis.

2.5.8 Análisis de los clones positivos

Se realizaron cultivos con los clones positivos para la extracción de los fósmidos. El fósforo pCC1FOS es un vector de copia única, que puede inducirse a multicopia (10-200

copias por célula) con la solución de autoinducción, proporcionada por el kit para poder purificar suficiente cantidad de ADN fosmídico para su análisis. Los cultivos fueron de 2 mL de volumen, en tubos de vidrio, con LB-cloranfenicol suplementado con la solución de autoinducción, inoculados con los clones positivos. Se dejaron crecer 16 h a 37°C bajo agitación orbital continua de 225 r.p.m. Entonces se emplearon para realizar las extracciones, con *FosmidMAX™ DNA Purification Kit* (Epicentre), a partir de 1.5 mL de cultivo.

Las extracciones de ADN fosmídico se enviaron al servicio de secuenciación del Servicio de Ayuda a la Investigación (SAI) de la UDC, para secuenciar sus extremos con los primers pCC1_Fos_Rev y T7 (Tabla 6) y poder determinar las secuencias clonadas en cada uno de ellos por comparación con la secuencia del genoma de *T. thermophilus* HB27.

2.6 Métodos analíticos

2.6.1 Estimación de la concentración y calidad del ADN por espectrofotometría

La absorción a diferentes longitudes de onda de una muestra de ADN puede ofrecer información acerca de su concentración y su grado de pureza. Para el análisis, la muestra fue convenientemente diluída en agua bidestilada (5 µL de muestra y 995 µL de agua bidestilada) y su absorbancia se midió en un espectrofotómetro *Cecil CE 2041* empleando cubetas de cuarzo de 1 mL. Usando A_{260} se puede determinar la concentración de ADN en la muestra teniendo en cuenta el factor de dilución y sabiendo que una A_{260} de 1.0 se corresponde con una concentración de 50 µg/mL de ADN de doble cadena. Por medio de este procedimiento se pueden cuantificar concentraciones de ADN dentro de un rango de 5-10 ng/mL hasta 50 µg/mL.

Para medir la concentración de ADN también se empleó el aparato *Nanophotometer* (IMPLEN) utilizando el programa para medir la concentración de ADN de doble hebra. Para la medida se necesitaron 3.5-5 µL de muestra que se depositaron en la superficie de una cubeta de medición con tapa y se procedió a realizar la medida.

La relación A_{260}/A_{280} , nos indica la pureza de la muestra de ADN. Valores entre 1.8 y 1.9 indican muestras de ADN con un alto nivel de pureza. Para muestras contaminadas con proteínas, que presentan un pico de absorción a 280 nm, el valor de esta relación sería menor.

La relación A_{260}/A_{230} , también es un indicador de la pureza del ADN. En este caso el valor esperado para una muestra pura sería de 2.0. En caso de que hubiera contaminación con sustancias que absorben cerca de 230 nm, como es el caso de carbohidratos, EDTA, fenol u otras sustancias orgánicas, el valor sería menor.

2.6.2 Biomasa.

La concentración celular se determinó turbidimétricamente a una longitud de onda de 600 nm. Para obtener medidas fiables, los cultivos fueron diluidos adecuadamente con medio estéril para obtener una medida de absorbancia dentro del rango 0.1-1.

2.6.3 Medida de la concentración proteica

Método Bradford

La concentración proteica se determinó empleando el método de Bradford (Bradford, 1976), un método colorimétrico que nos permite detectar cantidades de proteínas de hasta 1 µg/mL. Este método se basa en el empleo del colorante Azul de Coomassie, que es de color rojo bajo condiciones ácidas, y que se une a los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas formando un complejo de color azul, cuya absorbancia puede ser medida a 595 nm y es una medida de la concentración proteica.

Para cuantificar las muestras se preparó 1 mL de cada muestra problema convenientemente diluida en agua bidestilada, de ahí se tomaron 800 µL y se llevaron a 1 mL con el reactivo *Protean-assay* de *Bio-Rad*. Las muestras se agitaron vigorosamente con la ayuda de un *vortex* y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se determinó su absorbancia a 595 nm, empleando un blanco preparado del mismo modo que las muestras, en el cual la muestra proteica se sustituyó por agua bidestilada. La recta de calibrado se elaboró con albúmina de suero bovino (BSA), en cantidades comprendidas entre 1 y 25 µg.

Espectrofotometría

La concentración de proteína purificada se estimó por espectrofotometría. Las proteínas en solución absorben la luz ultravioleta con un pico máximo a 280 nm, gracias a la absorción de los aminoácidos con anillos aromáticos. Midiendo su absorbancia a 280 nm y aplicando la ley de Lambert-Beer se puede calcular la concentración de proteína:

$$[\text{ }]\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L} = (\text{Abs}_{280} * \text{factor de dilución}) / \epsilon$$

donde ϵ es el coeficiente de extinción molar de la proteína, que en el caso de la esterasa recombinante tiene un valor de 1.944 M⁻¹cm⁻¹ (asumiendo que los residuos de cisteína están reducidos). Este valor se obtuvo mediante la herramienta ProtParam de la página web "ExPASy Proteomics Server" (<http://www.expasy.ch/>).

2.6.4 Medida de la concentración de azúcares reductores.

El consumo de azúcares a lo largo del cultivo se determinó por medio del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Bernfeld, 1951). Este método se basa en una reacción

de oxidación-reducción: el grupo aldehído libre de los azúcares reductores reduce el DNS a ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico, un compuesto aromático con un pico de absorción a 540 nm cuya cantidad puede ser estimada espectrofotométricamente.

Para realizar las medidas, en tubos de 12 mL se mezcló 1 mL de muestra con 1 mL de Reactivo A. Se incubaron a 100°C durante 5 minutos, y entonces se añadieron 10 mL de agua bidestilada y se midió la absorbancia a 540 nm. La concentración de las muestras se determinó empleando una recta patrón realizada con glucosa a concentraciones conocidas: 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL.

Para la preparación del Reactivo A en primer lugar se disolvieron 30 g de tartrato Na,K en 50-60 mL de agua destilada bajo ligera calefacción. En un recipiente aparte y bajo agitación se vertieron 20 mL de NaOH 2 M sobre 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A continuación se añadió bajo agitación la solución de tartrato sobre la suspensión de DNS en sosa. Se esperó a la disolución total y se llevó a un volumen de 100 mL con agua destilada. El reactivo se degrada rápidamente perdiendo sensibilidad, por lo que se guarda en una botella tapada con papel de aluminio.

2.6.5 Determinación de la actividad enzimática

Para medir la actividad de las enzimas recombinantes se llevaron a cabo métodos espectrofotométricos, empleando sustratos cromogénicos. En concreto, se emplearon sustratos sintéticos derivados del p-nitrofenol. Para medir la actividad lipolítica los sustratos empleados fueron ácidos grasos de distinta longitud unidos mediante un enlace éster a una molécula de p-nitrofenol, mientras que para medir actividad fosfatasa se empleó el p-nitrofenil fosfato (pNPP), un grupo fosfato unido a una molécula de p-nitrofenol mediante un enlace éster fosfato (Fig. 10A).

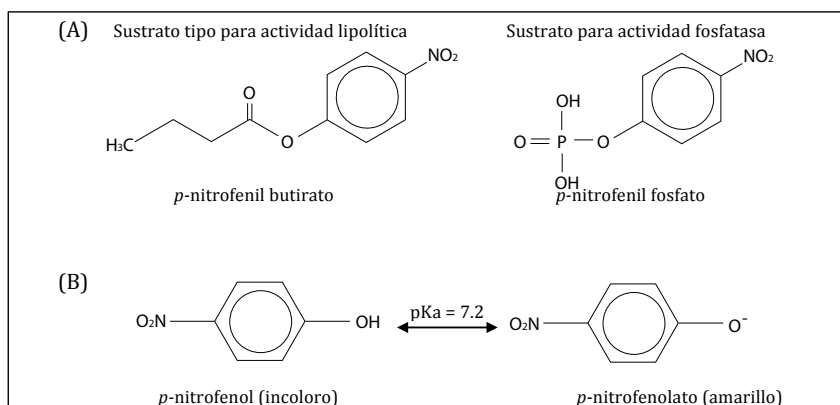


Figura 10: Esquema de las moléculas de sustrato y del comportamiento espectrofotométrico del p-nitrofenol.

Estos métodos se basan en las propiedades ópticas de la molécula de p-nitrofenol cuando se encuentra en solución. A pH ácido es incolora pero a pH básico, el p-nitrofenol se convierte en p-nitrofenolato, un compuesto de color amarillo con un pico de absorción en torno a los 400 nm (Fig. 10B). Cuando las enzimas hidrolizan los sustratos, liberan moléculas de p-nitrofenol cuya concentración se puede medir espectrofotométricamente, aumentando el pH de la mezcla de reacción, y la variación de absorbancia a lo largo del tiempo puede relacionarse con la tasa de conversión de sustrato por las enzimas mediante la ley de Lambert-Beer.

Actividad lipolítica

La reacción estándar para la estimación de actividad lipolítica consistió en un ensayo espectrofotométrico que empleó el p-nitrofenil laurato (*Fluka*) como sustrato, siguiendo el método descrito por (Fuciños *et al.*, 2005). Se empleó una disolución madre de p-nitrofenil laurato 25 mM disuelto en etanol. En tubos *Eppendorf* se mezclaron 800 μ L del tampón de reacción (tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8.5 ajustado a 65°C, con CaCl_2 40 mM) con 100 μ L de la solución madre de sustrato, y se incubaron 10 min a 65°C. Pasado este tiempo se añadieron 100 μ L del extracto enzimático, se mezcló y se incubó durante 20 minutos a 65°C. La reacción se detuvo añadiendo 250 μ L de Na_2CO_3 1 M frío para la desnaturalización de la enzima, y se mantuvieron los tubos en un baño de hielo durante 15 minutos. También precipitan los jabones formados por el ácido láurico liberado en la reacción saponificado con los iones Ca^{+2} procedentes del CaCl_2 . Finalmente, el precipitado formado se eliminó por centrifugación (14000 r.p.m, 10 min). En el sobrenadante se determinó la cantidad de p-nitrofenol, producido por la hidrólisis enzimática del p-nitrofenil laurato midiendo su absorbancia a 400 nm, frente a un blanco en el que se añadió agua bidestilada en lugar de extracto enzimático. El coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol es $17.215 \pm 0.002 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, en las condiciones en las que se realiza este experimento.

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que produce un 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones estándar del ensayo. Las actividades se expresan en U/L de medio de cultivo o en U/mg de proteína.

Actividad fosfatasa

Para medir la actividad fosfatasa se empleó el sustrato p-nitrofenil fosfato (pNPP) (Rao *et al.*, 2006). La reacción se llevó a cabo en tubos *Eppendorf*, en un volumen de 400 μ L con 50 μ L de enzima recombinante, que se colocaron en un bloque térmico, a una temperatura de 60°C. La composición del medio de reacción fue Tris/HCl pH 8.0, 5 mM ditiotretitol (DTT) y 20 mM MgCl_2 con una concentración de pNPP de 50 mM. El medio de reacción con el sustrato se incubó a la temperatura de reacción durante 5 min, tras lo cual se añadieron 100 μ L de enzima. A los 20 min de reacción se tomaron 100 μ L para realizar la medida y se paró la reacción por dilución con 200 μ L de NaOH 150 mM. Una

reacción con agua en lugar de enzima sirvió como blanco. La cantidad de p-nitrofenol, producido por la hidrólisis enzimática del p-nitrofenil fosfato se determinó midiendo la absorbancia a 400 nm. El coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol es $18.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, en las condiciones en las que se realiza este experimento.

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que produce un $1 \mu\text{mol}$ de p-nitrofenol por minuto en las condiciones estándar del ensayo. Las actividades se expresan en U/L de medio de cultivo o en U/mg de proteína.

2.7 Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica

2.7.1 Especificidad de sustrato

La especificidad de las enzimas lipolíticas frente a la longitud de la cadena lateral de los sustratos se midió usando varios p-nitrofenil ésteres de ácidos grasos de diferente tamaño: p-nitrofenil butirato (pNP4), p-nitrofenil laurato (pNP12), p-nitrofenil palmitato (pNP16) y p-nitrofenil estearato (pNP18) suministrados por *Fluka*. Las condiciones de reacción fueron las mismas que las empleadas para la medida de actividad lipolítica estándar, pero en este caso la solución madre de sustrato se preparó a una concentración de 5 mM en isopropanol para favorecer la disolución de los sustratos con ácidos grasos más largos, y por tanto más insolubles en agua.

2.7.2 Actividad lipolítica en función del pH

Se determinó el pH óptimo de reacción de las enzimas recombinantes llevando a cabo medidas de actividad lipolítica a diferentes valores de pH, entre 4.5 y 9.5. Las condiciones de reacción son las mismas que las del ensayo estándar pero reduciendo el tiempo de reacción a 10 min y empleando los siguientes tampones en los rangos de pH indicados: tampón 50 mM acetato/acético (pH 4.5–5.5), tampón 50 mM Tris/maleico (pH 6–7.5) y tampón 50 mM Tris/HCl (pH 7.5–9.5). Todos los tampones contienen CaCl_2 40mM, y su pH fue ajustado a 65°C, la temperatura de reacción.

2.7.3 Actividad lipolítica en función de la temperatura

Se determinó la temperatura óptima de reacción de las enzimas recombinantes llevando a cabo medidas de actividad lipolítica a diferentes valores de T° , entre 40 y 85°C. Las condiciones de reacción son las mismas que las del ensayo estándar pero reduciendo el tiempo de reacción a 10 min. El pH de los tampones fue ajustado a cada una de temperaturas ensayadas.

2.7.4 Termoestabilidad.

Se determinó la estabilidad de las enzimas recombinantes frente a la temperatura incubando las muestras enzimáticas a 85°C durante 10 h. A lo largo de este intervalo, se tomaron muestras en los tiempos prefijados y se guardaron a -20°C hasta el momento de medir su actividad lipolítica residual.

2.7.5 Cinética enzimática

Para medir la variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato se empleó el p-nitrofenil laurato en un rango de concentraciones de 1.5-0.0125 mM. Con los valores de actividad para cada una de las concentraciones se ajustaron a una cinética de Michaelis-Menten y se estimaron los parámetros de K_m y V_{max} .

2.8 Métodos de extracción de proteínas

2.8.1 Obtención de extractos crudos proteicos de levaduras

Para la obtención de extractos crudos proteicos de levaduras se empleó un método mecánico: rotura por agitación en vórtex con perlas de vidrio. Se empleó un tampón de extracción cuyos componentes favorecen la solubilidad de las proteínas para evitar la desnaturalización y agregación. Los compuestos cosmótopos, como el $(NH_4)_2SO_4$, son compuestos que estabilizan el estado nativo de las proteínas mediante la exclusión del solvente de la superficie de la proteína. Los compuestos caotrópicos, como el $MgCl_2$, evitan su agregación.

Se partió de un cultivo de levaduras en medio YPHSM de 72 horas de edad. Las células se recogieron por centrifugación a 7000 r.p.m. durante 10 min a 4°C. Posteriormente se lavaron primero con agua destilada fría y después con tampón de extracción (Tris-HCl 0.2 M, pH 7.8, $(NH_4)_2SO_4$ 0.3 M, $MgCl_2$ 10 mM, EDTA 1 mM, Glicerol 10%) frío. Una vez recogidas las células se resuspendieron en 1 mL de tampón de extracción frío (conteniendo el detergente anfótero CHAPS al 1% en el caso de la esterasa) por gramo de peso húmedo. Las células se rompieron mediante agitación vigorosa con vórtex durante diez pulsos de 20 segundos separados por pausas de 20 segundos en hielo, en presencia de perlas de vidrio de 425-600 μm lavadas con ácido (*Sigma*) hasta la mitad del volumen total. Dado que los clones proceden de la cepa de *S. cerevisiae* BJ3505, una cepa deficiente en proteasas, no es necesario añadir inhibidores de proteasas. Tras finalizar la ruptura mecánica se separaron las perlas de vidrio y los restos celulares por centrifugación a 8000 r.p.m. durante 15 min. Posteriormente se clarifica el extracto crudo por centrifugación a 13000 r.p.m. durante 30 min.

2.8.2 Fraccionamiento celular

Para el análisis de la distribución de las proteínas recombinantes expresadas entre los distintos compartimentos celulares se llevó a cabo el fraccionamiento celular siguiendo el método de Jigami *et al.* (1986) con modificaciones. El fraccionamiento se realizó en muestras tomadas en distintos momentos de cultivo: 24, 48 y 72 horas. Las fracciones obtenidas se guardaron a -20°C hasta el momento de determinar el contenido proteico y la actividad lipolítica.

Tras centrifugar las levaduras crecidas en medio YPHSM a 5000 r.p.m. durante 5 min se guardó el sobrenadante o fracción extracelular (S1). Las células se resuspendieron en 1 mL de solución A (Sorbitol 1.2 M, KH₂PO₄ 10 mM, pH 6.8 y 25 mM de 2-Mercaptoetanol) y se lavaron 2 veces. Entonces se resuspendieron de nuevo en 2 mL de solución B (Sorbitol 1.2 M, KH₂PO₄ 10 mM, pH 6.8 y 0.6% de Liticasa de *Arthrobacter luteus* de Sigma) y se incubaron entre 45 y 60 min a 30°C con agitación suave en un tubo. Durante el tiempo de incubación se controló la formación de protoplastos mediante disminución de la densidad óptica a 600 nm de 10 µL de la preparación al ser resuspendidos en 1 mL de agua destilada. Al carecer de pared, los protoplastos estallarían debido a la presión osmótica disminuyendo la turbidez, que sería cercana 0 cuando todas las células fuesen protoplastos. Posteriormente se centrifugó a 2.500 r.p.m. durante 4 min; el sobrenadante constituye la fracción periplasmática (S2). Los protoplastos se lisaron sometidos a un choque osmótico en presencia de agua destilada (2 mL) y se centrifugaron de nuevo. El sobrenadante contiene la fracción citosólica (S3) y el precipitado contiene restos celulares y de membranas (P1).

2.9 Técnicas electroforéticas

2.9.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para la separación electroforética de moléculas de ADN, tanto para el análisis de los productos de PCR como para el análisis de los productos de digestión con enzimas de restricción de los plásmidos, se utilizaron geles de agarosa al 1 %. Esta concentración es adecuada para separar eficientemente moléculas de ADN lineales con un tamaño comprendido entre 10 y 0.5 kb. Se emplearon como referencia de tamaño molecular distintos marcadores: el ADN del fago lambda digerido con *BstEII* (New England Biolabs) o *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (Fermentas).

Los geles de agarosa (Sigma) se prepararon utilizando el tampón Tris-EDTA-Acetato (Tris 0.04 M, EDTA 1 mM, acetato sódico 20 mM, ácido acético 30 mM, pH 8.0). La electroforesis se realizó utilizando voltajes entre 60 y 100 V en función del tamaño de los geles. La muestra de ADN se mezcló con el tampón de carga 10X (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xilen-cianol y 30% de glicerol en 1xTE) antes de cargarla en los pocillos del gel de electroforesis. La tinción de los geles se realizó por inmersión en una

solución tampón de electroforesis (Tris-EDTA-Acetato) con 0.01 % (v/v) de una solución *stock* de bromuro de etidio (10 mg/mL), durante 5-15 min. Transcurrido este tiempo se visualizaron las muestras exponiendo los geles a la luz ultravioleta en un transiluminador. El bromuro de etidio es un fluorocromo intercalante que se une específicamente al ADN o al ARN, permitiendo la visualización de estos ácidos nucleicos al ser expuestos a luz ultravioleta. Las imágenes de los geles se tomaron empleando el transiluminador *Biorad Universal Hood II*.

Como método alternativo al uso de bromuro de etidio, también se empleó el compuesto GelGreen (Biotium) para la tinción del ADN, que se añadió al tampón de carga 5X (0.125% de azul de bromofenol, 0.125% de xilen-cianol y 15% de glicerol en 1xTE) apartir de un *stock* 10000X.

2.9.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La separación de proteínas por electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. El SDS se une a las proteínas en una proporción de una molécula cada dos aminoácidos, enmascarando la carga propia de la proteína y dotándola de una carga negativa uniforme. Por tanto la migración de los complejos SDS-proteína tiene lugar únicamente en función de su tamaño.

La electroforesis se realizó siguiendo básicamente el método de (Laemmli, 1970) y empleando el sistema *Mini PROTEAN® 3 Cell* de *Bio-Rad*. Los geles se prepararon con una concentración de 5 % de acrilamida en el gel concentrador, y 10 o 12 % de acrilamida en el gel separador, dependiendo del tamaño de la proteína que se fuera a analizar. Se emplearon distintos marcadores como referencia de pesos moleculares: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (*Fermentas*) y el marcador *Broad Range* (*Bio-Rad*).

Las muestras se diluyeron con tampón de carga 2X (Tris-HCl 0.12 M pH 6.8, SDS al 6 %, glicerol 10 %, 2-Mercaptoetanol 15 % y azul de bromofenol 0.0025%) o con un tamón de carga 4X (doblemente concentrado), dependiendo del volumen de la muestra a cargar. La mezcla se incubó 10 min a 100°C para desnaturalizar las proteínas. La cubeta se rellenó hasta cubrir el gel con tampón de electroforesis (Tris/HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1 % pH 8.3) y se cargaron las muestras en los pocillos preparados en el gel concentrador. Las electroforesis se realizaron manteniendo el voltaje constante a 150 V y se detuvieron al llegar el azul de bromofenol al extremo inferior del gel.

2.9.3 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

La transferencia de las proteínas de geles a membranas de nitrocelulosa se realizó en un sistema *Mini Trans-Blot Cell* de *Bio-Rad*. Se humedecieron dos recortes de papel de filtro y las esponjas en el tampón de transferencia (Tris 25 mM pH 8.3, Glicina 192 mM,

Metanol 20% (v/v)) y se armó el dispositivo de transferencia con los siguientes elementos en el orden indicado: cátodo - esponja - papel de filtro doble - gel - membrana - papel de filtro doble - esponja - ánodo. La transferencia se llevó a cabo a 300 mA durante 1 h en frío.

2.9.4 Métodos de tinción y detección de proteínas

Tinción con Azul de Coomassie de geles SDS-PAGE

Después de llevar a cabo la electroforesis de las proteínas, se sitúan los geles en cubetas de plástico donde se vierte la solución de tinción (Ácido acético 10%, Azul de Coomassie 0.25 mg/mL), previamente calentada a 90°C, durante al menos 10 min en un agitador orbital. El exceso de colorante se elimina con la solución de destinción (Ácido acético 10%), también calentada previamente, bajo agitación orbital.

Zimograma - Tinción de actividad

Para visualizar las bandas con actividad lipolítica en el gel, se siguió el protocolo de renaturalización y revelado de actividad *in situ* descrito por (Fuciños *et al.*, 2005). Después de la electroforesis se sometieron los geles a un proceso de renaturalización lavándolos en 300 mL de tampón Tris/HCl 20 mM pH 8.0, conteniendo Triton X-100 al 0.5%, durante 20 min a 65°C bajo agitación suave. La solución de lavado se retiró, y la actividad lipolítica se detectó añadiendo simultáneamente una solución de α -naftil acetato 0.04% y otra de *Fast Red TR Salt* (Sigma) 0.1%, ambas preparadas en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0. Al tener lugar la hidrólisis del enlace éster del α -naftil acetato se liberan aniones naftol que reaccionan con la sal dando lugar a un precipitado rojizo. La aparición de bandas de color rojizo reveló la presencia de actividad esterásica.

Western blot

La detección por inmunofluorescencia de las proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa se realizó empleando el anticuerpo monoclonal antiFLAG-M2 producido en ratón (Sigma). Se bloqueó la membrana incubándola en 10 mL de tampón TBST (Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl, Tween20 0.05%) conteniendo 5 % de leche descremada (p/v) durante 2 horas a Tª ambiente o toda la noche a 4°C. En primer lugar se incubó la membrana bloqueada con el anticuerpo primario diluido (1:1000) en una disolución de leche descremada (5% p/v) en TBST, se añade a la membrana y se deja incubar durante 2 h. La membrana se lava tres veces con TBST y una con TBS. En segundo lugar se añadió el anticuerpo secundario, anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa de rábano, producido en conejo (Sigma), diluido (1:1000) en una disolución de leche descremada (5% p/v) en TBST, y se incubó durante 2 h. La membrana se sometió a tres lavados de 5 min con TBST y un último lavado de 10 min con TBS. Finalmente el revelado de las bandas se realizó empleando la solución recién preparada de 3,3'-Diaminobencidina

tetraclorada (DAB) (Sigma) (25 mL de Tris/HCl 50 mM, pH 7.6 en donde se disolvieron 15 mg de DAB y 15 mg de NiCl_2) que en presencia de 25 μL de peróxido de hidrógeno 33% p/v (Panreac) se convierte en un precipitado de color marrón por acción de la peroxidasa. Cuando las bandas fueron de la intensidad deseada se detuvo la reacción con agua corriente.

2.10 Métodos de manipulación de proteínas

2.10.1 Digestión enzimática de proteínas

Desglucosilación con EndoH

Durante la expresión heteróloga de proteínas en levaduras, las proteínas de secreción pasan por el retículo endoplasmático, donde sufren una serie de modificaciones post-traduccionales entre las que se incluye la N-glicosilación. Este fenómeno consiste en la unión de un oligosacárido de composición $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a los residuos de asparagina que se encuentran en la secuencia conservada Asn – X – Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto Pro). Este oligosacárido es modificado posteriormente, dando lugar a distintos tipos de carbohidratos con alto contenido en manosas y/o ramificados.

Esta modificación post-traduccional podría afectar a la actividad de las enzimas. Además, la glicosilación suele ser un fenómeno heterogéneo, por lo que sería una fuente de heterogeneidad en las muestras de proteínas destinadas a la obtención de cristales. La enzima Endoglicosidasa H elimina las N- glicosilaciones con oligosacáridos de alto contenido en manosa y algunos tipos de oligosacáridos híbridos, pero no complementamente, ya que deja una N-acetilglucosamina unida al residuo de asparagina (Fig. 11).

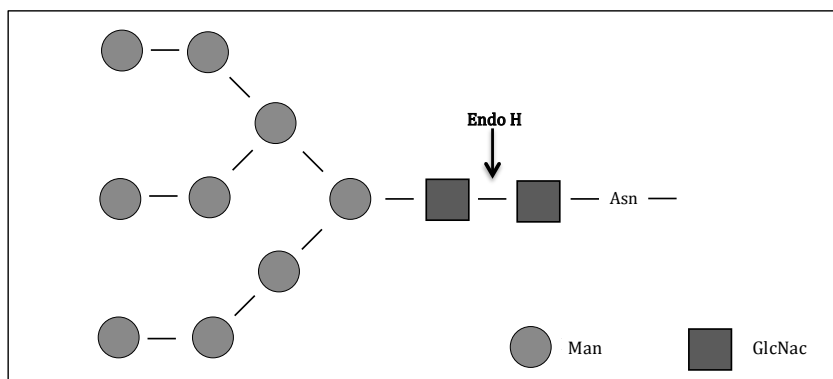


Figura 11: Esquema del punto de corte de la enzima Endoglicosidasa H tomando como sustrato un tipo de oligosacárido con alto contenido en manosa.

Para llevar a cabo la reacción de desglicosilación en condiciones desnaturalizantes se empleó la enzima Endoglicosidasa H o Endo H (*New England Biolabs*) siguiendo las instrucciones del manual. Se mezclaron 1-20 µg de proteína glicosilada purificada con 1 µL de *Glycoprotein Denaturing Buffer* 10X suministrado con la enzima y agua bidestilada hasta completar 10 µL, y se desnaturalizó a 100°C durante 10 minutos. Entonces se añadieron 2 µL de *Reaction Buffer* G5 10X, 1-5 µL Endo H y agua bidestilada hasta completar 20 µL. Se incubó la mezcla de reacción a 37°C durante 1-2 h.

Para los experimentos de cristalización, en los que se necesita la esterasa en su forma nativa, no se realizó el paso de desnaturalización y el tratamiento con Endo H se llevó a cabo durante 6 horas a 37°C siguiendo las instrucciones del manual.

Eliminación del péptido FLAG con la proteasa enterokinasa

La enzima enterokinasa es una proteasa que corta el péptido FLAG en su extremo carboxilterminal en las proteínas de fusión. Para llevar a cabo la digestión de las proteínas se siguieron las recomendaciones del suministrador, empleando 5 U de enterokinasa por cada µg de proteína recombinante y realizando la digestión a 37°C en tampón Tris/HCl 10 mM pH 8, CaCl₂ 10 mM. El tiempo de digestión fue de 2-12 h.

2.10.2 Concentración de proteínas

Concentración por filtración tangencial

Los extractos proteicos extracelulares empleados para la purificación de proteínas recombinantes fueron previamente concentrados. En primer lugar se filtraron a través de membranas de nitrocelulosa de 45 µm de diámetro de poro (*Millipore*) para evitar que pudieran tupid los dispositivos de purificación. Posteriormente fueron concentrados por ultrafiltración tangencial en un módulo con flujo en espiral *PREP/SCALE® -TFF2* (*Millipore*), con un tamaño de corte de 10 kDa, empleando un flujo de 6 L/min a una presión máxima de 5.5 Ba, manteniendo el concentrado en un baño de hielo.

Concentración con dispositivos Microcon/Amicon (Millipore)

Las proteínas eluidas de la cromatografía de afinidad se concentraron por ultrafiltración en los dispositivos *Microcon®* o *Amicon®* (*Millipore*), disponibles con membranas de distinto tamaño de corte. Para ello se centrifugaron los dispositivos con las muestras a 4°C siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

2.11 Técnicas cromatográficas

2.11.1 Cromatografía de inmunoadinidad

Para la purificación de las proteínas recombinantes fusionadas con el péptido FLAG se empleó una agarosa unida covalentemente a anticuerpos monoclonales anti-FLAG M2 (*Sigma*).

Siguiendo las indicaciones de la casa comercial, se emplearon 0.5 mL de agarosa que se equilibró con TBS (Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM), se resuspendió en el mismo tampón y se añadió al extracto proteico. La mezcla fue incubada a 4°C bajo agitación orbital continua durante al menos 3 h, y posteriormente se transfirió a una columna de cromatografía vacía (*Bio-Rad*), donde se dejó sedimentar la agarosa por gravedad. Se lavó la columna 3 veces con 5 mL de tampón TBS, y se realizó la elución de la proteína de fusión por competición con 500 µL de una solución que contiene el péptido FLAG (*Sigma*) a una concentración de 150 mg/mL (en el caso de la purificación de la esterasa recombinante, el tampón de elución contenía adicionalmente CHAPS al 1 %). Las fracciones eluidas fueron concentradas por ultrafiltración empleando dispositivos con membranas con tamaño de corte de 3 kDa.

Se recogieron alícuotas en cada uno de los pasos de la purificación para realizar la comprobación del proceso de purificación mediante medidas de concentración proteica, de actividad enzimática y mediante SDS-PAGE.

2.12 Técnicas cristalográficas

El primer paso para obtener cristales de proteína, es partir de una muestra de proteína lo más homogénea posible con un alto grado de pureza y concentración. Para la cristalización de la esterasa se llevaron a cabo experimentos de cristalización con diferentes lotes de proteína purificada por cromatografía de afinidad y concentrada en Amicones de 10 kDa. Las variantes de la proteína que se emplearon fueron: esterasa recombinante, esterasa desglicosida (con posterior purificación) y esterasa mutante sin puntos de glicosilación. En todos los casos, el buffer en el que se encontraba la proteína era Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, CHAPS 1%, DTT 2 mM. Para realizar una aproximación a la cristalización preliminar de una proteína se necesita disponer de grandes cantidades de proteína purificada. Nuestro método de purificación, la cromatografía de inmunoadinidad para proteínas con el péptido FLAG rinde proteínas de alto grado de pureza pero no en grandes cantidades, lo que ha limitado el número de experimentos que se han realizado.

Para cristalizar una proteína es necesario llevarla desde una solución no saturada a un estado supersaturado, sobrepasando el límite de solubilidad de la proteína,

habitualmente por extracción del solvente por evaporación, de modo que la proteína abandona la fase soluble pasando a formar parte de la fase sólida. Se puede explicar este fenómeno mediante el diagrama de fases de la cristalización (Fig. 12). Si el cambio de estado llega a un punto muy alejado del punto de saturación, generalmente cuando se produce de manera rápida, la proteína pasará a formar parte de la fase sólida formando un precipitado amorfo (Zona de precipitación) (Fig. 12). Para generar cristales lo ideal es que la solución llegue lentamente a la zona de supersaturación inestable, donde tienen lugar eventos de nucleación de modo que se generen un bajo número de núcleos cristalinos de forma lenta y ordenada que continuarán creciendo en la zona metaestable por medio de la adición ordenada de moléculas de soluto (proteína), cuya concentración se irá reduciendo paulatinamente hasta llegar al punto de saturación.

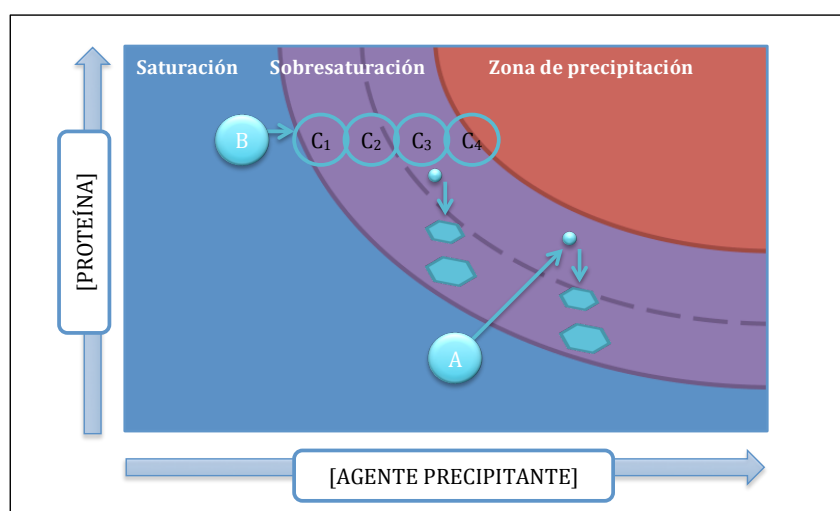


Figura 12: Diagrama de fases de cristalización donde se muestra el proceso de formación y crecimiento de cristales a través de distintos métodos. (A) Método de difusión de vapor: la proteína se lleva de un estado saturado a un estado sobresaturado, por concentración del agente precipitante y proteína mediante evaporación, hasta que se alcanza la zona inestable de la región de sobresaturación. En esta zona se forman los núcleos cristalinos, y se va consumiendo proteína y reduciendo su concentración hasta alcanzar la zona metaestable donde dichos núcleos crecen para formar cristales que siguen creciendo hasta llegar de nuevo a la zona de saturación. (B) Método de contradifusión en capilares: el agente precipitante entra en el capilar creando un gradiente de concentración de agente precipitante (C1, C2, C3, C4, etc), de modo que en algún punto se dan las condiciones ideales para la formación de los núcleos cristalinos, consumiendo proteína de modo que se llega a la zona metaestable para el crecimiento de los cristales.

Los factores que pueden influir en el proceso de cristalización son muy variados: tipo y concentración de agente precipitante (sales, polímeros, solventes orgánicos), temperatura, pH y la propia proteína. Incluso la técnica empleada afecta a la cinética del proceso, de modo que diferentes técnicas pueden dar lugar a diferentes resultados bajo

las mismas condiciones. Cada proteína tiene unas propiedades físico-químicas únicas, de modo que predecir las condiciones más adecuadas para su cristalización es prácticamente imposible. La metodología para cristalizar proteínas es puramente empírica. Consiste en la búsqueda de condiciones, tan sistemáticamente como sea posible, en las que se observen cristales y la optimización de las variables para obtener cristales de suficiente tamaño y orden interno para permitir la obtención de patrones de difracción de alta calidad y resolución (McPherson, 2009).

2.12.1 Método de difusión de vapor en gota sentada

El método de difusión de vapor es uno de los métodos más empleados para obtener cristales de proteína. Una de sus variantes es la gota sentada, que consiste en una cámara sellada herméticamente que contiene un reservorio con la solución madre de agente precipitante, y una pequeña plataforma cóncava, donde se sitúa una gota que consiste en una mezcla de proteína y solución precipitante en una relación de volumen, habitualmente, de 1:1 (Fig. 13). Debido a la diferencia entre concentraciones el agua se evapora de la gota hacia el reservorio hasta llegar al equilibrio. Esto hace que la concentración de agente precipitante en la gota aumente lentamente hasta llegar a un estado supersaturado, en el que las moléculas de proteína ven reducida su solubilidad y tiene lugar la nucleación y el crecimiento de los cristales (Fig. 12A).

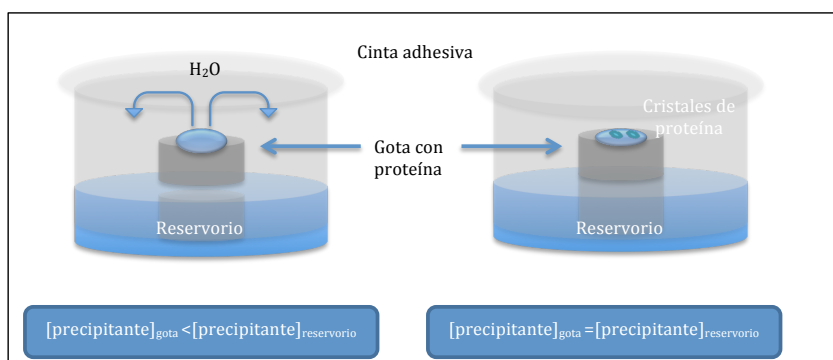


Figura 13: Esquema del método de difusión de vapor por gota sentada.

Para llevar a cabo los ensayos de difusión de vapor en gota sentada se emplearon inicialmente los kits comerciales JBS PACT++ y JBS JCSG++ HTS (Jena Bioscience), cada uno de los cuales proporcionan una batería de 96 soluciones de cristalización distintas, que permiten hacer una primera búsqueda de condiciones de cristalización de manera rápida y sencilla. Las soluciones del kit JBS PACT++ consisten en combinaciones sistemáticas de diferentes valores de pH, aniones y cationes en presencia de polietilenglicol (PEG). Las soluciones del kit JBS JCSG++ HTS son condiciones de

cristalización variadas que han dado resultados positivos en estudios de cristalización de alto rendimiento, y que incluyen otros agentes precipitantes diferentes a los del kit del primero.

Se emplearon placas para 96 condiciones de gota sentada (SWISSCI MRC 2 Well) con 70 μL de cada solución por reservorio y gotas compuestas por 0.3 μL de solución de proteína purificada y 0.3 μL de solución de precipitación. Estos experimentos se llevaron a cabo a 4°C.

2.12.2 Optimización de las condiciones de cristalización

Una vez identificadas las condiciones en las que se producía cristalización, la optimización de condiciones se llevó a cabo en placas de 24 condiciones CombiClover, con reservorio de mayor volumen con 500 μL de solución de precipitación y gotas, a no ser que se indique lo contrario, de 2 μL (1 μL de solución de proteína purificada y 1 μL de solución precipitante).

2.12.3 Contradifusión en fase líquida

Otro de los métodos para la obtención de cristales es la contradifusión en fase líquida. La solución con el agente precipitante se pone en contacto con la solución de proteína y difunde creando un gradiente de condiciones, de modo que se pueden explorar en cada experimento un gran número de condiciones de cristalización y en algún punto se puede encontrar la combinación adecuada para la formación y crecimiento de los cristales.

Este método emplea, generalmente, capilares que contienen la solución proteica, a través de los cuales se crea un gradiente longitudinal de condiciones lo que produce a su vez un gradiente en los resultados, empezando generalmente con un precipitado amorfo en el punto de contacto de la solución con el agente precipitante que va consumiendo la proteína presente en el tubo. A medida que continúa la difusión se produce precipitación en condiciones menos supersaturadas y se puede llegar a conseguir la formación de grandes cristales en zonas alejadas del comienzo del capilar (Fig. 12B).

Para llevar a cabo los ensayos de cristalización en capilares se emplearon distintas condiciones procedentes del kit *Granada Crystallization Box*® (GCB) (Triana tech) con tubos capilares de cristal de 40 mm de longitud y 0.2 mm de diámetro interno. Para cada condición se introdujo un tubo en la solución de proteína que se llenó por capilaridad, se selló la parte superior con una pasta proporcionada por el kit. Posteriormente se introdujo en la cámara que contenía la solución de cristalización, a través de un gel que se sitúa en la parte superior, de manera que se forma un pequeño tapón en la parte inferior del capilar. Este tapón tiene como función retardar la mezcla de las dos soluciones. Se cerró herméticamente la cámara y se incubó a 4°C para la formación de cristales.

Para ensayar condiciones distintas a las proporcionadas por el kit se emplearon dispositivos de fabricación propia, que consistían en cubetas de espectrofotómetro de 1.5 mL. Se dispuso una capa de gel de agarosa al 1% en el fondo, se llenaron con 1 mL de la solución con agente precipitante a ensayar. La parte superior de los capilares que contenían la proteína se sellaron con una pasta selladora y se clavaron en la agarosa. Las cubetas se sellaron con parafilm y se incubaron a 4°C.

2.12.4 Siembra por estría

Esta técnica se empleó en combinación con el método de cristalización por difusión de vapor en gota sentada, para inducir el crecimiento de cristales mediante la introducción de microcristales procedentes de cristales previamente obtenidos. Para ello se empleó un pelo de bigote de gato, con el que se tocaron los cristales, de manera que se recogieron microcristales de su superficie. Estos microcristales se depositaron en gotas frescas dibujando una línea con el pelo por su superficie. Para evitar sembrar con demasiados microcristales, las gotas se dispusieron por duplicado, y después de tocar una única vez el cristal se sembraron dos gotas con la misma composición consecutivamente, de modo que en la segunda el número de microcristales depositados sería menor.

2.13 Herramientas bioinformáticas

Para la búsqueda de proteínas homólogas se empleó el programa BLAST del NCBI (Altschul, 1990) y para realizar los alineamientos el Clustal W (Larkin *et al.*, 2007)

El análisis *in silico* de las proteínas se llevó a cabo empleando distintas herramientas bioinformáticas disponibles online en la página web "ExPASy Proteomics Server" (<http://www.expasy.ch/>). Para la predicción de posibles dianas de N-glicosilación se empleó la aplicación NetNGlyc 1.0 Server; para la predicción de la localización subcelular y lugar de escisión de una señal de secreción se empleó el program SignalP 3.0 Server (Bendtsen *et al.*, 2004). También se usó la aplicación ProtParam, que ofrece varios parámetros físico-químicos de una proteína que pueden ser deducidos a partir de su secuencia, tales como la composición aminoacídica y atómica, peso molecular, punto isoelectrico y coeficiente GRAVY (Kyte, 1982), entre otros.

3. Resultados y discusión

3.1 Selección de las enzimas lipolíticas del genoma de *T. thermophilus* HB27 para su clonación y expresión heteróloga.

El genoma de *T. thermophilus* HB27 está completamente secuenciado (Henne *et al.*, 2004). Al realizar una búsqueda en la base de datos del genoma de *T. thermophilus* HB27

con las palabras clave “lipase”, “esterase” y “carboxilesterase”, se obtienen 9 loci que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Secuencias obtenidas a partir de la búsqueda por las palabras clave “lipase”, “esterase” y “carboxilesterase” en el genoma de *T. thermophilus* HB27.

Locus	Descripción	Tamaño proteína codificada	Referencia Proteína
TT_C0552	Esterasa	132 aa/15.2 kDa	YP_004527.1
TT_C0749	Proteína relacionada con ferrienterobactina esterasa	312 aa/35.6 kDa	YP_004722.1
TT_C0824	Fosfolipasa	376 aa/ 42.4 kDa	YP_004797.1
TT_C0904	Esterasa putativa	329 aa/ 36.0 kDa	YP_004875.1
TT_C1278	Dominio 1 de diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa	360 aa/40.6 kDa	YP_005247.1
TT_C1341	Carboxilesterasa	230 aa/ 25.7 kDa	YP_005310.1
TT_C1494	Esterasa	133 aa / 15.1 kDa	YP_005463.1
TT_C1623	Lipasa putativa	161 aa/ 18.0 kDa	YP_005592.1
TT_C1787	Carboxilesterasa	515 aa/56.2 kDa	YP_005756.1

Se seleccionaron dos de estos genes para su clonación y estudio:

- En primer lugar se seleccionó el gen que codifica para la esterasa putativa YP_004875.1 entre las que estaban anotadas en la base de datos de genoma de *T. thermophilus*, en función de la similitud con la proteína nativa de 32 kDa (Fuciños *et al.*, 2005) purificada en el grupo de investigación de la Universidad de Vigo con el que colaboramos en el proyecto de investigación en el que se desarrolló la presente tesis. Posteriormente a la clonación su identidad fue confirmada por el equipo de Vigo mediante MALDI-TOF-MS.
- El segundo gen seleccionado fue el que codifica para la lipasa putativa YP_005592.1, por ser la única anotada como lipasa dentro del genoma.

Los genes seleccionados se amplificaron a partir de ADN genómico de *T. thermophilus* HB27, obtenido mediante el método CTAB, empleando los cebadores en los que introdujeron en los extremos de los fragmentos amplificados regiones de homología a las regiones adyacentes al sitio de clonación múltiple del plásmido YEpFLAG-1 (Tabla 6).

Los genes se clonaron en el plásmido YEpFLAG-1 fusionados con la señal de secreción del factor α de levaduras, presente en el vector, que dirigirá la secreción de las proteínas recombinantes expresadas, y bajo el control del promotor *ADH2* de levaduras y el terminador *CYC1*. En el caso de la esterasa se clonó el gen a partir del codón 17, eliminando la parte correspondiente a la señal de secreción nativa. El plásmido proporciona además un péptido etiqueta FLAG en el extremo amino-terminal de la proteína de fusión, que permite la detección inmunológica y la purificación por afinidad de las proteínas de fusión.

Para cada construcción, células de *S. cerevisiae* BJ3505 se cotransformaron por el método del acetato de litio con cada producto de PCR y con el plásmido YEpFLAG-1 previamente linearizado por digestión con *Eco* RI y *Sal* I (Takara). La selección de los transformantes que contenían los plásmidos recombinantes se realizó en placas de medio selectivo CM-trp.

3.2 Esterasa de *T. thermophilus* HB27

3.2.1 Caracterización *in silico*

El análisis con herramientas bioinformáticas de YP_004875.1 mostró que el pI y peso molecular teórico de la putativa esterasa eran 8.38 y 36 kDa respectivamente. Con el programa SignalP 3.0 server se detectó la presencia de un péptido señal de secreción con el punto de corte situado entre los residuos en las posiciones 16 y 17 (ALA-QG); y también la presencia de una región hidrofóbica entre los residuos situados en las posiciones 6 y 26. La proteína presentaba dos posibles sitios de N-glicosilación (en las posiciones 146 NHTN y 282 NYTY), y un valor GRAVY (*Grand average hydropathicity index*) de -0.048 que se corresponde con una proteína ligeramente hidrofílica.

Cuando esta enzima fue identificada y estudiada por primera vez, no existían secuencias de esterases muy similares (Fuciños *et al.*, 2011a), pero los numerosos proyectos de secuenciación de genomas han generado una gran cantidad de información genómica desde esa fecha. Al realizar una búsqueda de secuencias homólogas por BLASTp, la esterasa YP_004875.1 mostró alta identidad (85-78%) con diecisiete esterases de especies pertenecientes al género *Thermus*, cuyos genomas han sido secuenciados en los últimos años (2013-2014), siendo las que mostraron mayor similitud las esterases de: *Thermus islandicus* (WP_022797935, 84% de identidad), *Thermus aquaticus* (WP_003047954.1, 85% de identidad), *Thermus* sp. YIM 77409 (WP_038056291.1, 85% de identidad), *Thermus yunnanensis* (WP_038042870.1, 85% de identidad), *Thermus* sp. RL (WP_008632708.1, 85% de identidad) y *Thermus igniterrae* (WP_026175182.1, 85% de identidad). También mostró una identidad moderada (54-47%) con cinco esterases de especies del género *Meiothermus*, también de publicación reciente.

3.2.2 Comprobación de transformantes

Una vez realizada la transformación en *S. cerevisiae* BJ3505, se seleccionaron 5 clones al azar y para comprobar la autenticidad de los transformantes se ensayó la actividad lipolítica extracelular en cultivos en tubos de vidrio tras 72 h de incubación. Se observó que la mayoría de los candidatos Sc-EST mostraron elevados niveles de actividad lipolítica extracelular, superiores a 1500 U/L (Fig. 14). Se seleccionó la cepa ScEST3-O por su mayor producción, de alrededor de 3500 U/L.

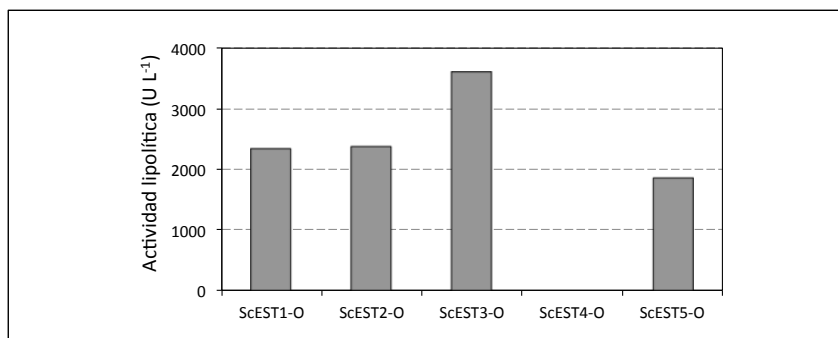


Figura 14: Actividad lipolítica de los 5 transformantes ScEST comprobados.

El plásmido recombinante de la cepa ScEST3-O se extrajo de las células de levaduras con *Spin Clean™ Plasmid Miniprep Kit* (Metabion), se propagó en *E. coli* DH10B para obtener suficiente ADN recombinante y la corrección de la construcción se verificó por secuenciación.

3.2.3 Producción de la enzima recombinante

Para la expresión de la esterasa recombinante, la cepa ScEST3-O se cultivó en matraz, y se tomaron muestras de cultivo a intervalos de tiempo regulares. En la Figura 15A se muestra un perfil típico de la producción lipolítica de esta cepa. La expresión del gen, clonado en el YEpFLAG-1, está controlada por el promotor de la levadura *ADH2*, que está sujeto a represión por glucosa. Por tanto, la producción de proteína heteróloga no puede comenzar hasta que se agota la glucosa del medio. Tras 24 h de cultivo, toda la glucosa (medida por el método DNS) del medio ha sido consumida (datos no mostrados), comenzando la producción de actividad lipolítica. La actividad aumenta rápidamente hasta el tercer día de cultivo, cuando las células alcanzan la fase estacionaria de crecimiento.

La pérdida del plásmido de las células recombinantes durante el primer día de cultivo en YPHSM, un medio no selectivo, es inapreciable, pero aumenta hasta alcanzar el 90% en el tercer día (Fig. 15B). A pesar de la aparente baja estabilidad plasmídica, los niveles de actividad encontrados en el medio de cultivo de ScEST3-O superan altamente (alrededor de 10 veces) los mejores valores obtenidos en cultivo de *T. thermophilus* HB27 bajo condiciones óptimas (Deive *et al.*, 2009b).

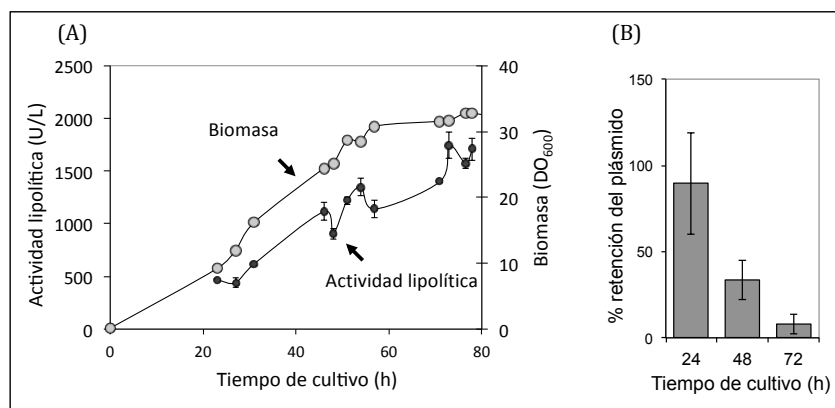


Figura 15: (A) Perfil típico de crecimiento y producción de actividad lipolítica de la cepa ScEST3-O en medio YPHSM. (B) Estabilidad plasmídica en cultivos de la cepa recombinante ScEST3-O en medio YPHSM. Los datos muestran la media \pm desviación estándar (N=2) .

Aunque la proteína nativa es una proteína de secreción, permanece en gran parte unida a la célula en cultivos de *T. thermophilus* HB27 (Fuciños *et al.*, 2011a). Para comprobar si en los cultivos de levaduras la proteína está asociada a las células o no, se realizó el fraccionamiento celular de la cepa ScEST3-O cultivada en medio YPHSM y se midió la actividad lipolítica de las fracciones. Los resultados obtenidos mostraron que la esterasa recombinante extracelular constituía tan sólo una parte minoritaria de la proteína total producida por la levadura. La mayoría de la enzima, más del 80%, queda retenida en el espacio periplásmico (Fig. 16A). La actividad total (suma de todas las fracciones) obtenida en los cultivos (Fig. 16B) es más de 30 veces superior a los mejores valores obtenidos en cultivos de *T. thermophilus* HB27, usando medios de cultivo optimizados que contienen aguas termales en su formulación (Fuciños *et al.*, 2008).

Por tanto, la clonación del gen que codifica para la proteína YP 004875.1 en *S. cerevisiae* BJ3505 usando el sistema YE_pFLAG-1, representa una mejora en la producción notablemente superior a las conseguidas en la producción de la enzima por su organismo original, *T. thermophilus* HB27.

3.2.4 Purificación

Mientras que en el compartimento celular la enzima recombinante podría presentarse en dos formas, con su porción aminoterminal procesada y no procesada, se esperaba que los extractos de medio extracelular tuvieran únicamente la forma madura de la proteína recombinante. Por esta razón la enzima fue purificada exclusivamente a partir del medio extracelular.

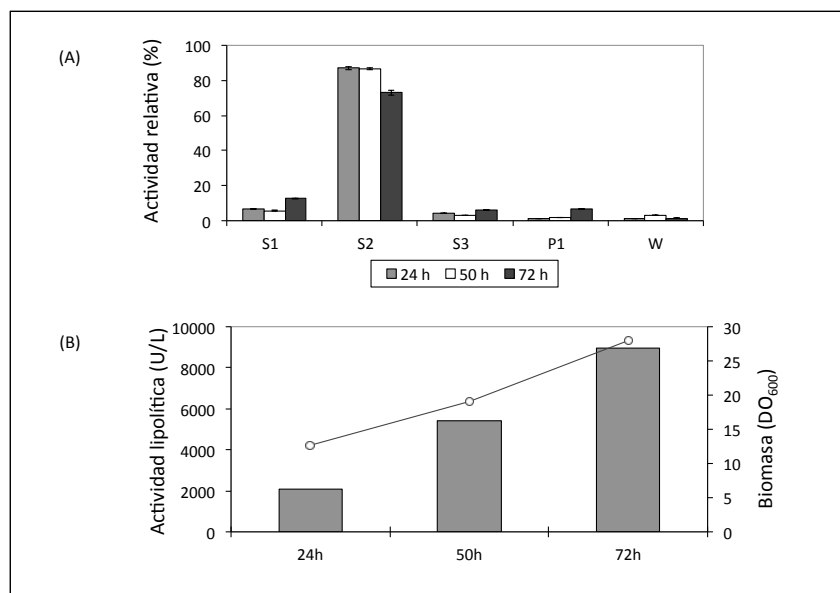


Figura 16: (A) Compartimentalización de la actividad lipolítica producida por la cepa recombinante ScEST3-O en medio YPHSM: medio extracelular (S1), fracción periplásmica (S2), fracción citoplasmática (S3), restos de membranas (P1) y lavados (W). Los valores muestran la media \pm desviación estándar (N=2). (B) Actividad lipolítica total (intra- y extracelular) producida por la cepa recombinante ScEST3-O en medio YPHSM. Las columnas indican la actividad lipolítica y los círculos la biomasa.

Se partió de 2 L de volumen de cultivo, repartido en 4 matraces *Erlenmeyer* de 2L de capacidad. El medio de cultivo libre de células de la cepa ScEST3-O (extracto crudo) se filtró a través de membranas de nitrocelulosa (0.45 μ m de tamaño de poro) y se concentró por ultrafiltración tangencial hasta obtener un volumen de 100-150 mL. La enzima fue purificada a partir del concentrado por cromatografía de inmunoafinidad. Se obtuvo un factor de 44 veces, y un rendimiento del 4% a partir del extracto crudo filtrado. El proceso de purificación se resume en la tabla 9. Además, este rendimiento es susceptible de incrementarse repitiendo varias veces el procedimiento de purificación con el mismo extracto crudo (parte no unida) y gel de afinidad después de la restauración y re-equilibrio de la columna. En este caso, el proceso fue repetido 3 veces.

Tabla 9: Resumen del proceso de purificación de la esterasa putativa recombinante de *T. thermophilus* HB27 producida por la cepa ScTTE3-0.

Etapas de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Factor purificación
Extracto crudo + filtración (0.45 µm)	135.11	839.08	6.21	100.00	1.00
Ultrafiltración (10kDa)	76.62	628.49	8.20	74.90	1.32
Cromatografía de afinidad	0.13	36.28	273.15	4.32	43.98

*La actividad lipolítica se determinó empleando p-nitrofenil laurato como sustrato (65°C, pH 8).

El análisis por SDS-PAGE de la proteína purificada mostró tres bandas de proteína (Fig. 17A), que también se revelaron por Western-blot empleando un anticuerpo contra el péptido FLAG (Fig. 17B). Las tres bandas presentan actividad en un zimograma de detección de actividad esterásica (Fig. 17C).

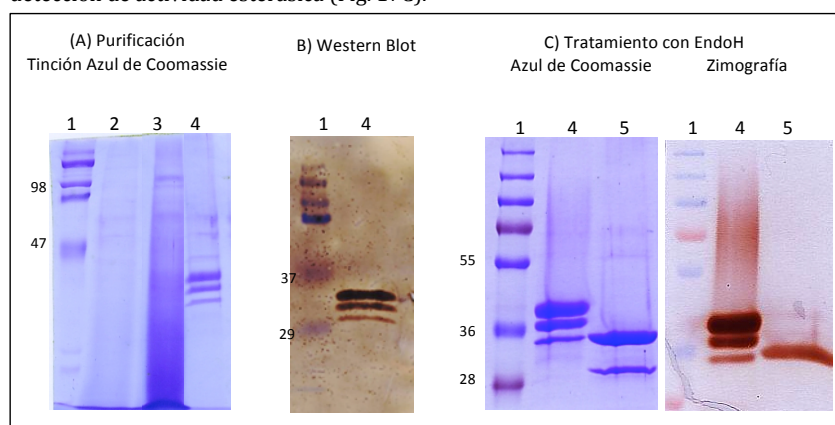


Figura 17: (A) SDS-PAGE de la purificación de la enzima TTE recombinante teñido con Azul de Coomassie. (B) Western-blot con anticuerpo anti-FLAG. (C) Proteína TTE recombinante purificada tratada con Endoglicosidasa H, SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie y zimograma. Contenido de los carriles: (1) marcador de pesos moleculares (kDa); (2) medio extracelular; (3) medio extracelular concentrado por ultrafiltración; (4) mezcla de las eluciones obtenidas por cromatografía de afinidad; (5) enzima purificada tratada con Endo H.

El análisis de secuencia aminoacídica de la proteína YP 004875.1 con NetNGlyc 1.0 Server mostró que presentaba dos posibles dianas de N-glicosilación (en las posiciones 146 NHTN y 282 NYTY). Para comprobar si las diferentes bandas detectadas en la electroforesis de la proteína purificada se correspondían con diferentes formas glicosiladas, la proteína purificada se trató con la enzima Endoglicosidasa H. La proteína desglicosilada se mostró como una única banda por análisis SDS-PAGE, con un peso molecular que coincidía con el predicho para la secuencia (Fig. 17C), y confirma que las dos bandas de mayor peso molecular se debían a diferentes estados de glicosilación de

la proteína (la banda de bajo peso molecular que aparece por debajo de la esterasa desglucosilada se corresponde con la enzima Endoglicosidasa H).

3.2.5 Caracterización bioquímica

Especificidad de sustrato

Se determinó la actividad de la esterasa secretada al medio extracelular empleando como sustratos p-nitrofenil ésteres con diferente longitud de cadena de pNP4, pNP12, pNP16 y pNP18. El pNP4 mostró una elevada autohidrólisis en las condiciones ensayadas y no fue posible medir la actividad con este sustrato adecuadamente.

En la Figura 18A se observa que la esterasa recombinante mostró preferencia por sustratos con cadena de longitud media, y la actividad descendía al aumentar la longitud de la cadena. La enzima mostró una preferencia destacable por pNP12 y la actividad cae abruptamente (99%) cuando se usan sustratos de mayor longitud. Estos resultados están de acuerdo con la especificidad de sustrato de la proteína nativa (E34Tt), la cual muestra preferencia por sustratos con cadena de longitud media (pNP10), y cuya actividad con pNP16 fue 99% menor (Fuciños *et al.*, 2011a). Los resultados obtenidos también concuerdan con estudios previos de especificidad de sustrato en extractos impuros de otras cepas de *Thermus* (Domínguez *et al.*, 2004).

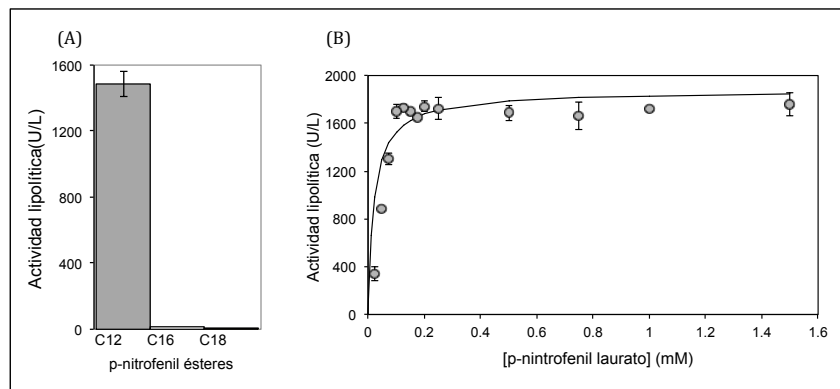


Figura 18: Especificidad de sustrato (A) y cinética de Michaelis-Menten para la esterasa recombinante empleando pNP12 como sustrato (B). Los datos muestran la media \pm desviación estándar, N=3.

La proteína nativa, YP 004875.1, está anotada en el genoma de *T. thermophilus* HB27 como una esterasa putativa (Henne *et al.*, 2004). Por tanto, los resultados obtenidos confirman que la enzima recombinante expresada en *S. cerevisiae* es de hecho una esterasa, con preferencia por sustratos con cadenas laterales de longitud media-corta.

Cinética enzimática

Se cuantificaron las velocidades iniciales de reacción de la esterasa recombinante en función de la concentración de pNP12, y se ajustaron adecuadamente a un modelo Michaelis-Menten ($r^2=0.85$), lo que confirma la clasificación de la enzima como esterasa ante la ausencia de fenómeno de activación interfacial (Verger, 1997). Los parámetros de ajuste fueron: $V_m = 1869$ U/L y $K_m = 0.023$ mM (Fig. 18B, Tabla 10).

Efecto del pH en la actividad lipolítica

El efecto del pH en la actividad de la esterasa recombinante fue estudiado en un rango de pH de 4.5 a 9.5 (Fig. 19). La enzima mostró una actividad máxima a pH de 7.5-8.5. El perfil de actividad en función del pH es similar al observado para la enzima nativa, que muestra un pH óptimo de 8.5, y mantiene un 25-50% de su actividad a pH 4.5-6.

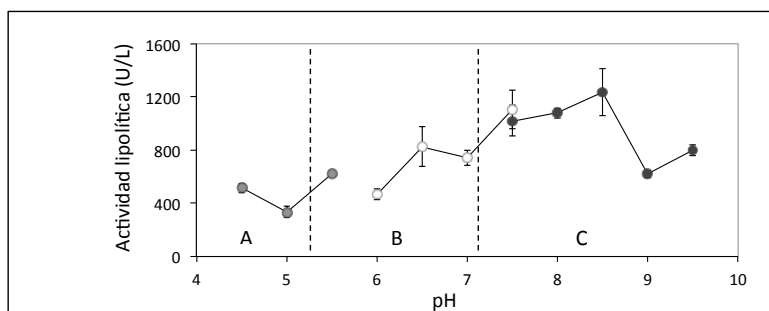


Figura 19: Actividad lipolítica de la enzima recombinante a varios valores de pH. Tampones: (A) acetato de sodio/ácido acético (pH 4.5-5.5), (B) Tris/ácido maleico (6-7.5), (C) Tris/HCl (7.5-9.5); todos a 50 mM conteniendo 40 mM CaCl_2 . Los datos muestran la media \pm desviación estándar, $N=3$.

Efecto de la temperatura en la actividad lipolítica

La temperatura óptima de la esterasa recombinante se determinó variando la temperatura de reacción desde 40 hasta 85°C bajo las condiciones estándar de ensayo (Fig. 20). La enzima mostró una actividad máxima a 40°C y un descenso de la actividad a temperaturas más altas. Esta tendencia es la contraria a la enzima nativa de *T. thermophilus* que mostraba un óptimo de temperatura a 80°C (Fuciños *et al.*, 2011a).

Esta discrepancia en cuanto a la temperatura óptima se podría atribuir a la presencia del péptido FLAG amino-terminal o a la presencia de oligosacáridos unidos a la enzima, ninguno de ellos presentes en la enzima nativa. Para comprobar estas hipótesis, se determinó la actividad óptima de la enzima recombinante purificada después de someterla a desglicosilación, eliminación del péptido FLAG, y ambos tratamientos

combinados. Sin embargo, no se observaron cambios en la temperatura óptima bajo las condiciones ensayadas (Fig. 20).

Estudios posteriores, publicados después de realizar estos experimentos, demostraron que la eliminación de parte del extremo amino-terminal tendría un papel importante en la variación de la temperatura óptima (Fuciños *et al.*, 2011b). Por otra parte, no existen datos estructurales de la proteína nativa ni de la proteína expresada en levaduras, con lo que no se puede descartar que el plegamiento de la proteína a temperaturas mesófilas, distintas a las nativas, afecte a su temperatura óptima. Un comportamiento similar se observó para el proteosoma 20S del termófilo *Methanococcus jannaschii*. El proteosoma recombinante, expresado a temperaturas mesófilas, mostró una temperatura óptima de 95°C, 24°C menor que la óptima nativa (119°C). lo que se atribuyó a un plegamiento deficiente (Frankenberg *et al.*, 2001).

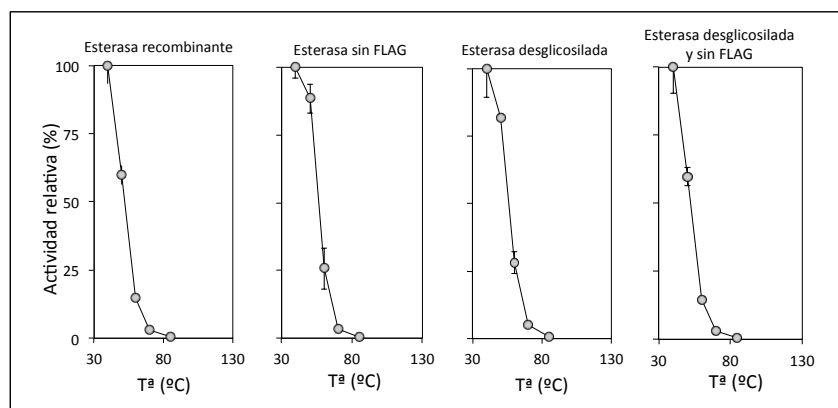


Figura 20: Actividad lipolítica de la enzima recombinante en función de la temperatura y después de los tratamientos indicados. Tampón Tris/HCl 50 mM (pH 8.5 ajustado a cada una de las temperaturas ensayadas), conteniendo CaCl₂ 40 mM. Los datos muestran la media ± desviación estándar, N=3.

Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de la esterasa recombinante fue determinada por incubación durante 10 h a 85°C y medida de la actividad lipolítica a intervalos de tiempo predefinidos (Fig. 21). Para obtener los parámetros que definen la desactivación cinética, los datos experimentales se ajustaron a un modelo de primer orden:

$$LA(t) = LA_0 e^{-kt}$$

Donde LA(t) representa la actividad lipolítica en función del tiempo, expresado como porcentaje de la actividad lipolítica inicial (LA₀), y k es la constante térmica de desactivación.

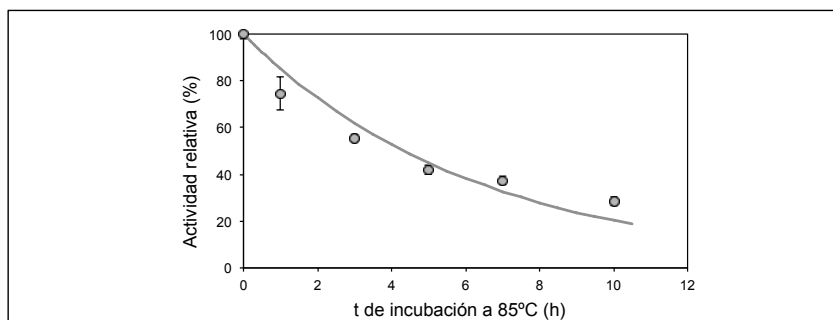


Figura 21: Actividad residual de la esterasa recombinante tras incubación a 85°C. Los datos muestran la media \pm desviación estándar, N=2.

El perfil de desactivación mostró un buen ajuste al modelo de primer orden ($r^2=0.914$, Tabla 10), con una predicción de vida media de 4 h y 20 min. Contrariamente a la temperatura óptima, la termoestabilidad de la enzima recombinante es incluso mayor que la de la enzima nativa, que mostró una vida media de 2 h y 15 min a 85°C en presencia de 1% CHAPS. Hay que destacar que la termoestabilidad de la enzima recombinante fue medida en ausencia de CHAPS, mientras que en el caso de la proteína nativa, el uso de bajas concentraciones de CHAPS (0.01 %) condujeron a una pérdida del 70% de la actividad inicial y la vida media se redujo a 25 min (Fuciños *et al.*, 2011a). Esta diferencia estaría relacionada con la delección en la esterasa recombinante de los 17 primeros residuos aminoacídicos del extremo amino terminal, una secuencia de naturaleza hidrofóbica crítica para la estabilidad y actividad de la enzima (Fuciños *et al.*, 2011b). Los valores de termoestabilidad obtenidos para ambas enzimas, recombinante y nativa, fueron altos y superiores a otras esterases aisladas de organismos hipertermófilos tales como *Pyrococcus furiosus* (Almeida *et al.*, 2006) y *Thermococcus litoralis* (Singleton & Littlechild, 2001).

Como ya se ha mencionado, las enzimas de organismos termófilos son a menudo consideradas como adecuadas para su uso en biotransformaciones industriales gracias a que exhiben una alta termoestabilidad. Sin embargo, la actividad de estas enzimas a temperaturas mesófilas suele ser relativamente baja. Las características del biocatalizador ideal incluirían por tanto alta termoestabilidad y actividad a temperaturas mesófilas (Mnisi *et al.*, 2005), para poder llevar a cabo las reacciones enzimáticas a temperaturas mesófilas, con el consecuente ahorro de energía, al mismo tiempo que se puede prolongar su uso en el tiempo gracias a su estabilidad. La esterasa recombinante aquí descrita presenta ambas características, por lo que resulta un candidato potencial para aplicaciones industriales.

Tabla 10. Estimación de parámetros y coeficientes de regresión del modelo de Michaelis-Menten, y el modelo de desactivación de primer orden aplicado a la desactivación térmica de la esterasa a 85°C.

Modelo de primer orden			Modelo Michaelis-Menten		
$t_{1/2}$ (h)	k (h ⁻¹)	r^2	V_{\max} (U/L)	K_m (mM)	r^2
4.33	0.160	0.914	1869	0.02255	0.8514

3.2.6 Aproximación a la cristalización de la esterasa recombinante.

La esterasa recombinante fue sometida a ensayos de cristalización para la obtención de cristales de proteína, necesarios para la determinación de su estructura por rayos X, empleando distintos dispositivos y técnicas cristalográficas.

Una de las claves para obtener cristales es tener una proteína lo más pura y homogénea posible. En una muestra de proteína purificada puede haber cierta microheterogeneidad, que suele venir dada por proteólisis o por oxidación de cisteínas, por ello se suelen añadir agentes reductores e inhibidores de proteasas. En nuestro caso la proteólisis no es un factor crítico, ya que además de ser una proteína termófila, que suelen ser en general bastante resistentes a la proteólisis, ha sido expresada en una levadura deficiente en proteasas. Pero contiene una cisteína de modo que durante la etapa de concentración con dispositivos Amicon se cambia el tampón y se añade DTT a la muestra a una concentración de 2 mM.

También puede haber otras fuentes de heterogeneidad en la muestra como, en nuestro caso, debido a modificaciones post-traduccionales. Como hemos visto la proteína recombinante posee dos dianas de glicosilación y se expresa en tres formas: sin glicosilar, glicosilada en un punto y glicosilada en dos puntos. Por ello no sólo se realizó una búsqueda de condiciones favorables a la cristalización empleando la esterasa recombinante, sino que también se modificó la proteína y se observó el comportamiento de las distintas variantes en los experimentos de cristalización. Se llevaron a cabo experimentos de cristalización con la esterasa desglicosilada enzimáticamente y también con una esterasa mutante, sin dianas de glicosilación, que se obtuvo modificando el vector recombinante por mutagénesis puntual.

3.2.6.1 Purificación de la esterasa recombinante

Los ensayos de cristalización de la esterasa fueron realizados con distintos lotes de proteína purificada. La esterasa recombinante así como la variante mutante, se purificaron por ultrafiltración tangencial y cromatografía de afinidad. Se emplearon dispositivos Amicon de 10 kDa (Millipore) para concentrar y cambiar el tampón de purificación (Tris/HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, CHAPS 1%) por uno de la misma composición pero que contenía también DTT 2 mM.

La esterasa desglicosilada se obtuvo al tratar la esterasa recombinante con la enzima endo-H en condiciones nativas. Se realizaron ensayos de cristalización con la esterasa desglicosilada y también con esterasa desglicosilada que fue purificada por cromatografía de afinidad y concentrada de nuevo, para eliminar la enzima endo-H.

La concentración de las proteínas de los diferentes lotes varió entre cada experimento y se detalla en cada uno de ellos. En la Fig. 22 se muestra el análisis por electroforesis de diferentes lotes y se indica la concentración de proteína de cada uno.

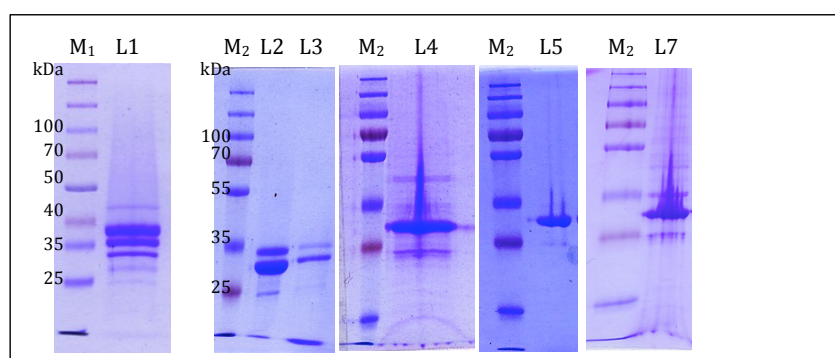


Figura 22: SDS-PAGE de la esterasa purificada en los distintos lotes. Tinción con Azul de Coomassie. Contenido de los carriles: M₁: marcador de pesos moleculares *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas); M₂: marcador de pesos moleculares *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas); L1: lote 1, esterasa glicosilada, 4.87 mg/mL; L2: lote 2, esterasa desglicosilada, 7.65 mg/mL; L3: lote 3, esterasa desglicosilada y posteriormente purificada, 0.83 mg/mL; L4: lote 4, esterasa desglicosilada, 5.06mg/mL; L5: lote 5, esterasa desglicosilada, 5.32 mg/mL; L7: lote 7, esterasa mutante, 5.5 mg/mL.

3.2.6.2 Búsqueda de condiciones de cristalización con kits comerciales

Como un estudio preliminar para llegar a cristalizar la esterasa se ensayó la formación de cristales de proteína en distintas condiciones, empleando distintos kits comerciales, y con distintas versiones de la esterasa (glicosilada, parcialmente desglicosilada con la enzima Endo H y una versión con mutaciones en las dianas de glicosilación).

Esterasa recombinante glicosilada

Con la proteína recombinante glicosilada purificada (Fig. 22, L1) se realizaron experimentos de cristalización mediante difusión en gota sentada con el kit comercial JBS PACT++ (Jena Biosciences) y mediante difusión en capilares con una selección de condiciones del kit comercial GCB (Triana Tech).

En el ensayo con el kit JBS PACT++, sólo se obtuvo precipitado amorfo en las condiciones que contenían PEG 3550 y PEG 6000 como agente precipitante, y en algunas gotas se podían ver aceites (Fig. 23).

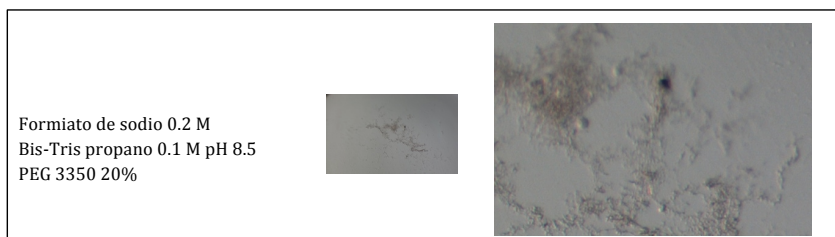


Figura 23: Fotografía de los aceites encontrados en una de las gotas de cristalización con la enzima glicosilada (Fig. 22, L1) en el kit JBS PACT++.

En el ensayo con el kit GCB se seleccionaron condiciones que contenían distintos PEGs como agentes precipitantes (Tabla 11), y se obtuvieron agujas en una de las condiciones, con PEG 8000 (Tabla 11-C3, Fig. 24) y precipitado amorfo en las demás.

Tabla 11: Condiciones seleccionadas de los capilares del kit comercial GCB (Triana Tech) para realizar ensayos de cristalización de contradifusión.

Condición CGB	Composición
C1	PEG 4000 30%, MgCl_2 0.2 M, Tris/HCl pH 0.1 M 8.5
C2	PEG 4000 30%, Acetato amónico 0.2 M, Na/Acetato 0.1 M pH 4.6
C3	PEG 8000 20%, Acetato de Mg 0.2 M, Na/Cacodilato 0.1 M pH 6.5
C6	PEG 1500 30%
C8	PEG 4000 26%, Li_2SO_4 0.32 M, Tris/HCl pH 8.5 0.1 M

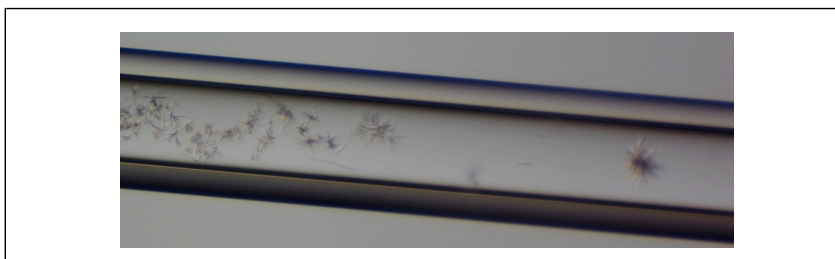


Figura 24: Agrupaciones de agujas obtenidas por contradifusión en capilares con la esterasa glicosilada (Fig. 22, L1). Condiciones: PEG 8000 20%, Acetato de Mg 0.2 M, Na/Cacodilato 0.1 M pH 6.5.

Esterasa recombinante desglicosilada

Con la esterasa recombinante desglicosilada se realizaron ensayos de cristalización con diferentes lotes de la esterasa recombinante desglicosilada, que diferían en su grado de desglicosilación y pureza. Con el kit comercial JBS PACT ++ se ensayaron dos lotes de

enzima glicosilada, los lotes 2 y 4, (Fig. 22, L2 y L4) y un lote de enzima desglicosilada y purificada, el lote 3 (Fig. 22, L3). Mientras que con el kit JCSG y los capilares se realizaron experimentos de cristalización únicamente con el lote 2 (Fig. 22, L2).

En los ensayos con el kit JBS PACT++ con el lote 2 se obtuvieron esferulitas a los 4 días de incubación en una de las condiciones (Fig. 25A) y en otra antes de un mes de incubación (Fig. 25B). Con el lote 4, de menor concentración pero en el que se consiguió un mayor porcentaje de desglicosilación, el comportamiento de la proteína fue diferente. Se obtuvo una separación de fases bastante fuerte en casi todas las condiciones en el momento de poner las gotas. Tras sólo un día de incubación ya se observaron agregados irregulares en dos condiciones (Fig. 25C-D), y a los 6 días también en otras dos condiciones (Fig. 25E-F). También se observaron esferulitas en distintas condiciones. Las esferulitas salieron en condiciones diferentes en los ensayos con cada lote, en cuanto a pH, tampón o sal presente, pero los agregados irregulares salieron en condiciones que coincidían en ciertos componentes: tenían PEG 6000 al 20% y cloruro de calcio.

En los ensayos con el kit JBS JCSG++ HTS con la esterasa desglicosilada del lote 2 se observaron esferulitas y aceites en 3 condiciones tras 3 días de incubación (Fig. 26B-D), y al cabo de 3 semanas en otra condición (Fig. 26A). A los 6 días se observaron agregados irregulares como los encontrados en el ensayo con el kit JBS PACT++, también en presencia de una sal de calcio, pero esta vez menos numerosos y de mayor tamaño (Fig. 26F).

La naturaleza proteica de estos agregados se comprobó mediante electroforesis. Se recogieron los agregados (Fig. 26E) con un asa y se sumergieron en una gota de solución con precipitante del reservorio. Los agregados eran robustos, y no se alteraron al ser manipulados. La gota se depositó en un tubo pequeño de PCR y se añadió agua bidestilada para disolver los agregados. También se analizó la gota de la figura 26B, donde no había precipitado, sólo esferulitas. Con una pipeta se dispuso en un tubo de 0.2 mL, se centrifugó brevemente y se separó el sobrenadante del precipitado, que se disolvió con agua bidestilada. Estas muestras se analizaron por SDS_PAGE, que confirmó que los dos tipos de agregado estaban formados por la esterasa en su forma desglicosilada (Fig. 27). En el sobrenadante se observa una banda de menor peso molecular que las de esterasa que ha formado las esferulitas y los agregados que se correspondería con la enzima Endoglicosidasa H, empleada para eliminar las glicosilaciones de la esterasa recombinante.

En los ensayos con el kit JBS PACT++ con la esterasa desglicosilada y purificada (Fig. 22, L3), que tenía una concentración muy inferior a las otras muestras de proteína (0.83 mg/mL), se observaron esferulitas a los 6-9 días de incubación (Fig. 28), la mayoría en condiciones que contenían PEG 1500 al 25 % como agente precipitante.

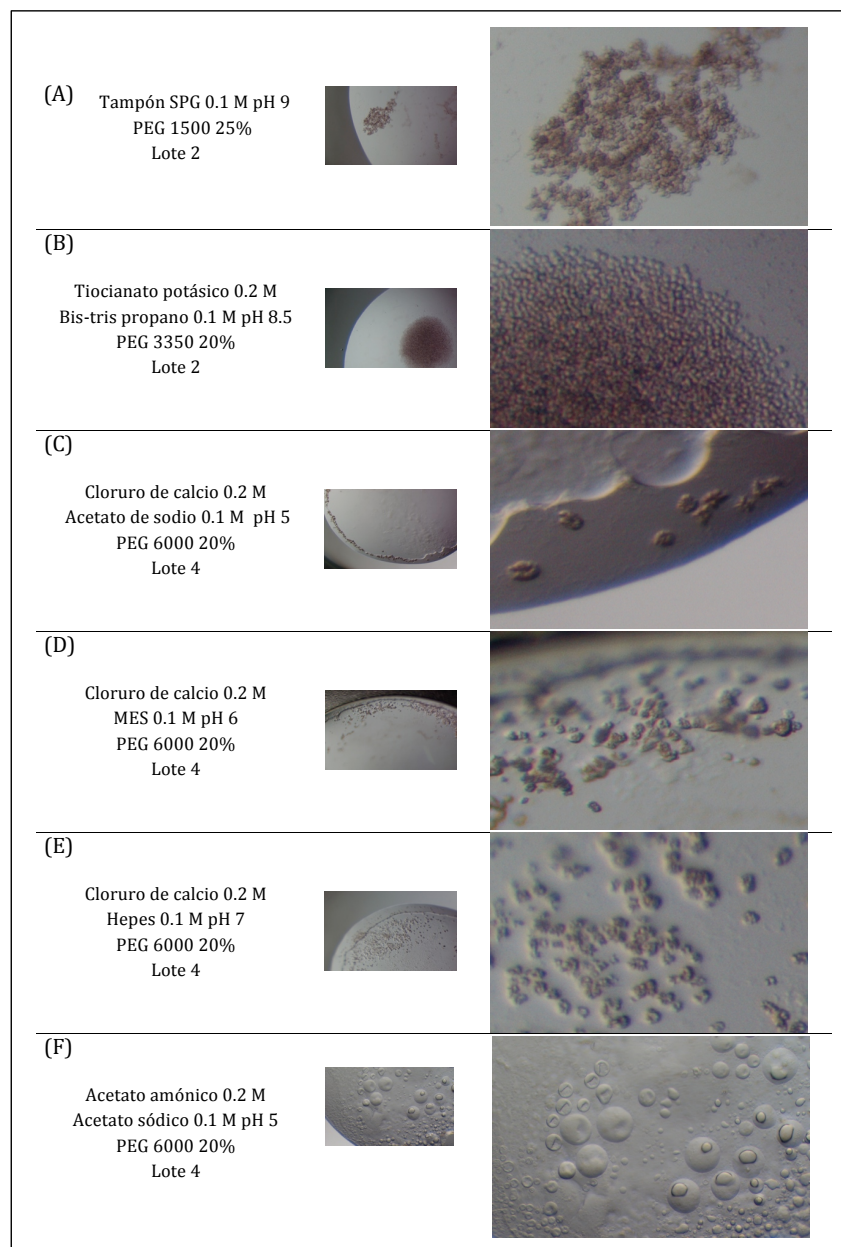


Figura 25: Resultados de los ensayos de cristalización preliminar de la esterasa desglucosilada con el kit comercial JBS PACT++.

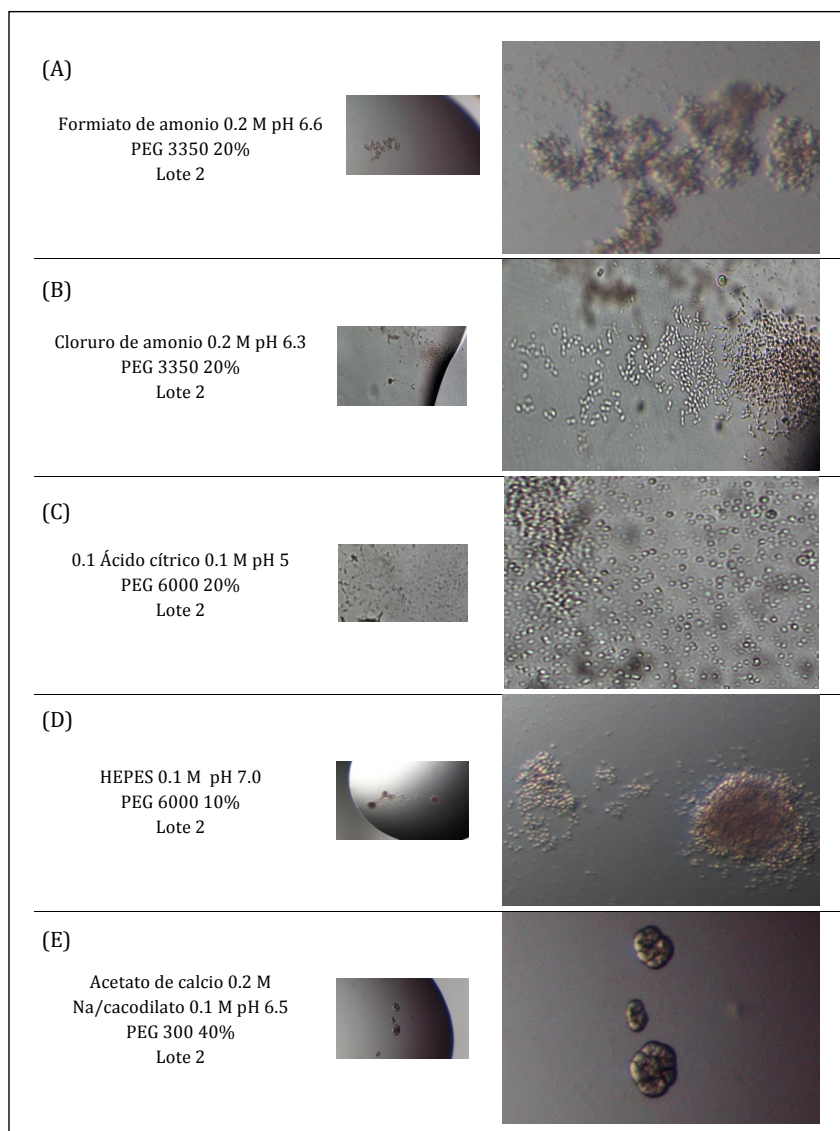


Figura 26: Resultados de los ensayos de cristalización preliminar de la esterasa desglucosilada con el kit comercial JBS JCSG++ HTS.

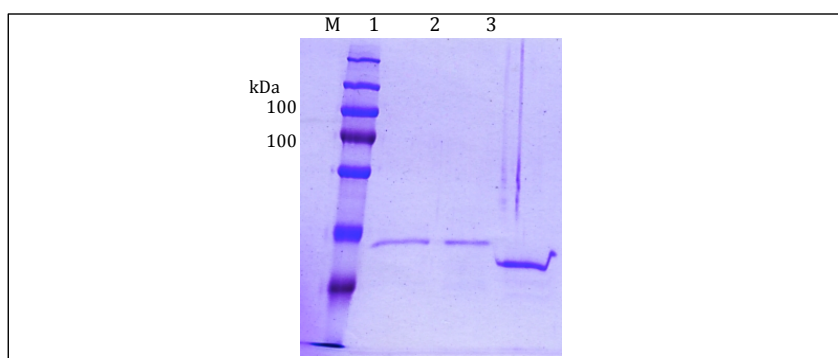


Figura 27: SDS-PAGE de las muestras de cristalización: M: marcador de pesos moleculares. 1: agregados disueltos de la gota de la figura 27E; 2: agregados disueltos de la gota de la figura 27B; 3: sobrenadante de la gota de la figura 27B.

En los ensayos de cristalización en capilares con la enzima desglucosilada del lote 4 (Fig. 22, L4) en la condición en la que aparecieron agujas con la esterasa glicosilada (Tabla 11-C3) se obtuvieron los mismos resultados, grupos de agujas (Fig. 29).

Esterasa mutante sin dianas de glicosilación

La última variante con la que se realizaron ensayos de cristalización fue la esterasa mutante (Fig. 22, L7), sin dianas de glicosilación, con las condiciones proporcionadas por los kits JBS PACT++ y JBS JCSG++ HTS.

En el ensayo realizado con el kit JBS PACT++ se observó separación de fases en casi todas las condiciones en el momento de poner las gotas. Tras dos meses se observaron agujas de gran tamaño en una de las condiciones (Fig. 30).

En el ensayo realizado con el kit JBS JCSG++ HTS, había muchas condiciones con separación de fases al comienzo del ensayo, y posteriormente fueron surgiendo agujas en distintas condiciones entre los 3 y 6 días de incubación (Fig. 31A-E). Las condiciones en las que se formaron las agujas de gran tamaño tan sólo tenían en común un pH bajo, mientras que las agujas de pequeño tamaño se formaron en presencia de cloruro de magnesio 0.2M y en presencia de PEGs de bajo peso molecular. A los 18 días de incubación se observaron agujas creciendo en torno a aceites en una de las gotas (Fig. 31F).

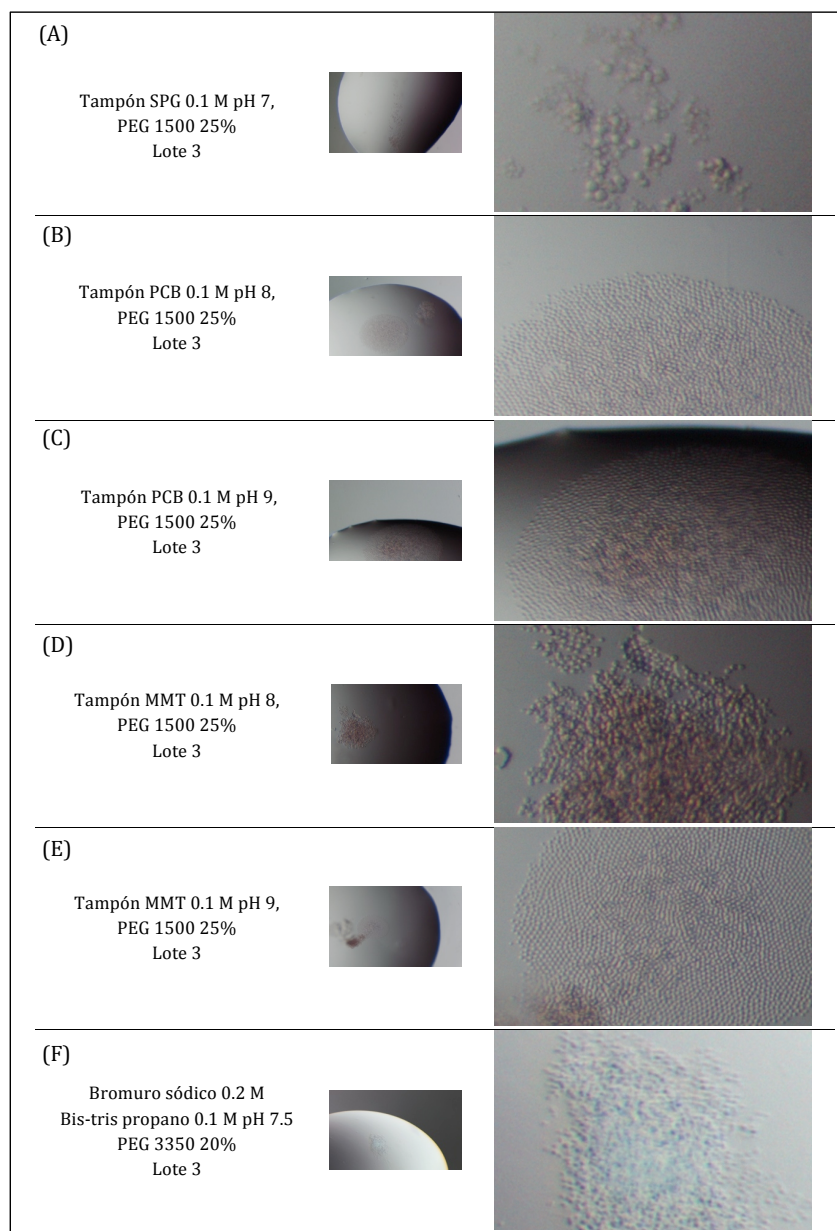


Figura 28: Resultados de los ensayos de cristalización preliminar de la esterasa desglucosilada y posteriormente purificada y concentrada (Fig. 22, L3) con el kit comercial JBS PACT++.

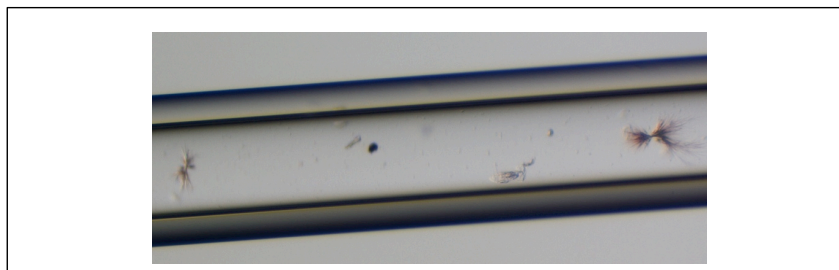


Figura 29: Agrupaciones de agujas obtenidas por difusión en capilares con la esterasa desglicosilada (Fig. 22, L4). Condiciones: PEG 8000 20%, Acetato de Mg 0.2 M, Na/Cacodilato 0.1 M pH 6.5.



Figura 30: Resultados de los ensayos de cristalización preliminar de la esterasa mutante sin dianas de glicosilación (Fig. 24, L7) con el kit comercial JBS PACT++.

Resumen cristalización con kits comerciales

Los mejores resultados obtenidos en los experimentos de cristalización con kits comerciales han sido agregados con la esterasa desglicosilada y agujas con la esterasa mutante (Tabla 12).

Tabla 12: Resumen de los mejores resultados obtenidos tras la búsqueda de condiciones de cristalización para la las distintas versiones de esterasa recombinante de *T. thermophilus* HB27 con los kits JBS PACT++, JBSJCSG++ HTS y capilares de CGB.

Versión de la esterasa	Resultados	Condiciones
Esterasa glicosilada	Grupos de agujas	Capilar con PEG 8000 20%, acetato de Mg 0.2 M, Na/Cacodilato 0.1 M pH 6.5.
Esterasa desglicosilada	Esferulitas	Varias condiciones.
	Agregados numerosos y pequeños	Varias condiciones con PEG 6000 20% y cloruro de calcio 0.2 M.
	Agregados grandes	Acetato de calcio 0.2 M y PEG 300 40%.
Esterasa desglicosilada y purificada	Esferulitas	Varias condiciones, la mayoría con PEG-1500 20%.
Esterasa mutante	Agujas grandes	Condiciones con valores de pH bajos .
	Agujas pequeñas	Condiciones con cloruro de Mg y PEGs de bajo peso molecular

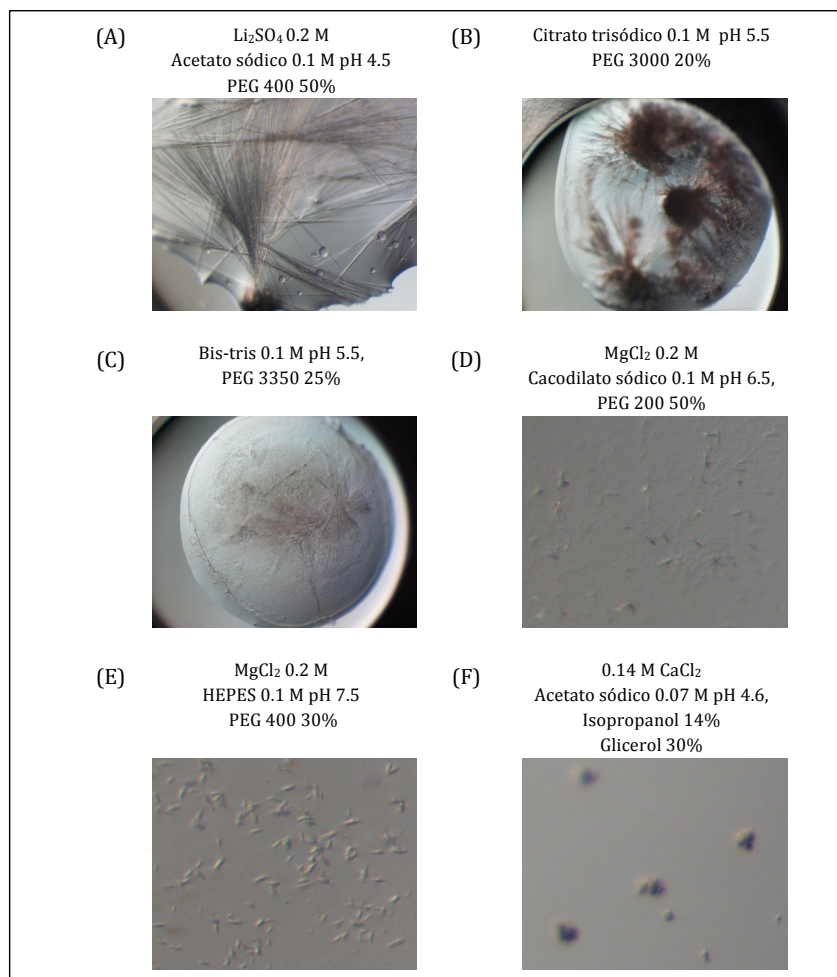


Figura 31: Resultados de los ensayos de cristalización preliminar de la esterasa mutante sin dianas de glicosilación (Fig. 22, L7) con el kit comercial JBS JCSG++ HTS.

3.2.6.3 Exploración de condiciones de optimización con mejores resultados

A la vista de los primeros resultados de cristalización (Tabla 12), se realizaron unos ensayos de optimización de la cristalización siguiendo dos vías distintas. En primer lugar, se realizaron experimentos con la esterasa desglucosilada a partir de las condiciones en las que se obtuvieron los agregados irregulares, en concreto, en aquellas

donde estos agregados eran menos numerosos y de mayor tamaño (Acetato de calcio 0.2 M, cacodilato sódico 0.1 M pH 6.5, PEG 300 40%) (Fig. 26E). En segundo lugar, se realizaron ensayos con la esterasa mutante a partir de la condición en la que las agujas habían salido más rápido, en ausencia de precipitado amorfo en la gota (0.2 M sulfato de litio, 0.1 M acetato sódico pH 4.5, 50% PEG 400) (Fig. 31A).

Esterasa recombinante desglicosilada

Se estudió la combinación de distintos PEGs, sales y pH en la cristalización de la esterasa desglicosilada (Fig. 22, L4 y L5) en cajas tipo CombiClover (Tabla 13, Cajas 1-4). Se obtuvieron agregados de aspecto más redondeado (Fig. 32) que los observados anteriormente. Los agregados se formaron únicamente en presencia de PEG 400 a una concentración de 35-45% con combinación con sales de calcio (Tabla 13, Cajas 2-4).

Tabla 13: Condiciones estudiadas en cajas CombiClover para la optimización de la cristalización de la esterasa desglicosilada, indicando el lote de esterasa purificada empleado en cada caso y los resultados obtenidos.

	Lote	PEG	Sales	Tampón	Resultado
Caja 1	Lote 4	PEG 400 (37-42%)		Tris/HCl 0.1 M pH 6,7,8 y 9	Precipitados suaves
Caja 2	Lote 5	PEG 400(25-50%)	Acetato de calcio 0.2 M	MES 0.1 M pH 6-6.5 HEPES 0.1 M pH 7-7.5	Agregados redondeados al 35 % PEG 400 y pH 7.5, 40% de PEG 400 en todos los pHs; PEG 400 y pH 6.5- 7.5.
Caja 3	Lote 5	PEG 8000 (15-20 %) PEG 3350 (18-23 %) PEG 1500 (23-28 %) PEG 400 (25-50 %)	CaCl ₂ 0.2M	MES 0.1 M pH 6	Agregados redondeados al 40% de PEG 400.
Caja 4	Lote 5	PEG 8000 (15-20 %) PEG 3350 (18-23 %) PEG 1500 (23-28 %) PEG 400 (25-50 %)	CaCl ₂ 0.2M	HEPES 0.1 M pH 7	Agregados redondeados al 40% de PEG 400.
Caja 5	Lote 6 10.35 mg/mL	PEG 400 50-35%,	Acetato de calcio 0.2 M	HEPES 0.1 M pH 7.5	Agregados redondeados, agujas y placas.

A continuación se realizó un ensayo sembrando núcleos cristalinos procedentes de agregados de la caja 2 (Tabla 13, Fig. 32), en una nueva caja (Tabla 13, Caja 5) con PEG 400 y pH 7.5, donde se habían observado un mayor número de agregados redondeados. También se ensayaron distintas proporciones de proteína y solución precipitante (1:1, 1:2, 2:1), siendo 2:1 la que mostró mejores resultados. El primer día de incubación se obtuvieron agujas en las condiciones con PEG 400 al 50%, que fueron aumentando su tamaño rápidamente (Fig. 33A). En los siguientes días se observaron agujas gruesas en

PEG 400 45%, que fueron creciendo lentamente convirtiéndose en placas alargadas (Fig. 33B) y pequeños agregados redondeados a lo largo de la línea de siembra en gotas con PEG 400 al 40-30% (Fig. 33C-D). En las gotas control donde no se hizo siembra se obtuvieron placas alargadas en gotas con PEG 400 50%, mas pequeñas en gotas con PEG 400 45-40% y agregados raros a menores concentraciones (Fig. 33E).

En los dispositivos para cristalización en capilares de fabricación propia se exploraron distintas condiciones a partir de la condición en la que se obtuvieron agujas previamente (PEG 8000 20%, Acetato de Mg 0.2 M, cacodilato sódico 0.1 M pH 6.5) y las condiciones en las que se obtuvieron agregados en gota sentada. Se emplearon distintas combinaciones de PEGs, sales y valores de pH (Tabla 14). Se obtuvieron esferulitas (Tabla 14, C1, C3 y C4), esferulitas a partir de las cuales crecieron agujas (C2, C5, C6, C7, C8) y grupos de agujas (C9, C10, C11) (Fig. 34).

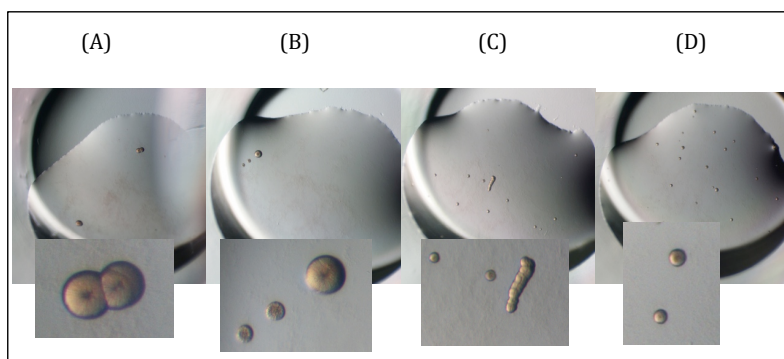


Figura 32: Agregados de aspecto redondeado obtenido en los experimentos de optimización de la cristalización con la esterasa desglicosilada. Se muestran las gotas de PEG 400 40% a pH 6 (A), 6.5 (B), 7 (C) y 7.5 (D). Caja 2 con el lote 5 de la Tabla 13.

Tabla 14: Condiciones de cristalización de los ensayos de optimización de cristalización con capilares, con esterasa desglicosilada (Tabla 13, L5).

Capilar	Condiciones
C1	PEG 8000 20%, Acetato de Mg 0.2 M, MES 0.1 M pH 6.
C2	PEG 8000 20%, Acetato de Mg 0.2 M, MES 0.1 M pH 6.5.
C3	PEG 8000 20%, Acetato de Mg 0.2 M, HEPES 0.1 M pH 7.
C4	PEG 8000 20%, Acetato de Mg 0.2 M, HEPES 0.1 M pH 7.5.
C5	PEG 400 45%, Ca acetate 0.2 M, MES 0.1 M pH 6.
C6	PEG 400 45%, Ca acetate 0.2 M, MES 0.1 M pH 6.5.
C7	PEG 400 45%, Ca acetate 0.2 M, HEPES 0.1 M pH 7.
C8	PEG 400 45%, Ca acetate 0.2 M, HEPES 0.1 M pH 7.5.
C9	PEG 400 45%, CaCl ₂ 0.2 M, MES 0.1 M pH 6.
C10	PEG 400 45%, CaCl ₂ 0.2 M, MES 0.1 M pH 6.5.
C11	PEG 400 45%, CaCl ₂ 0.2 M, HEPES 0.1 M pH 7.
C12	PEG 400 45%, CaCl ₂ 0.2 M, HEPES 0.1 M pH 7.5.

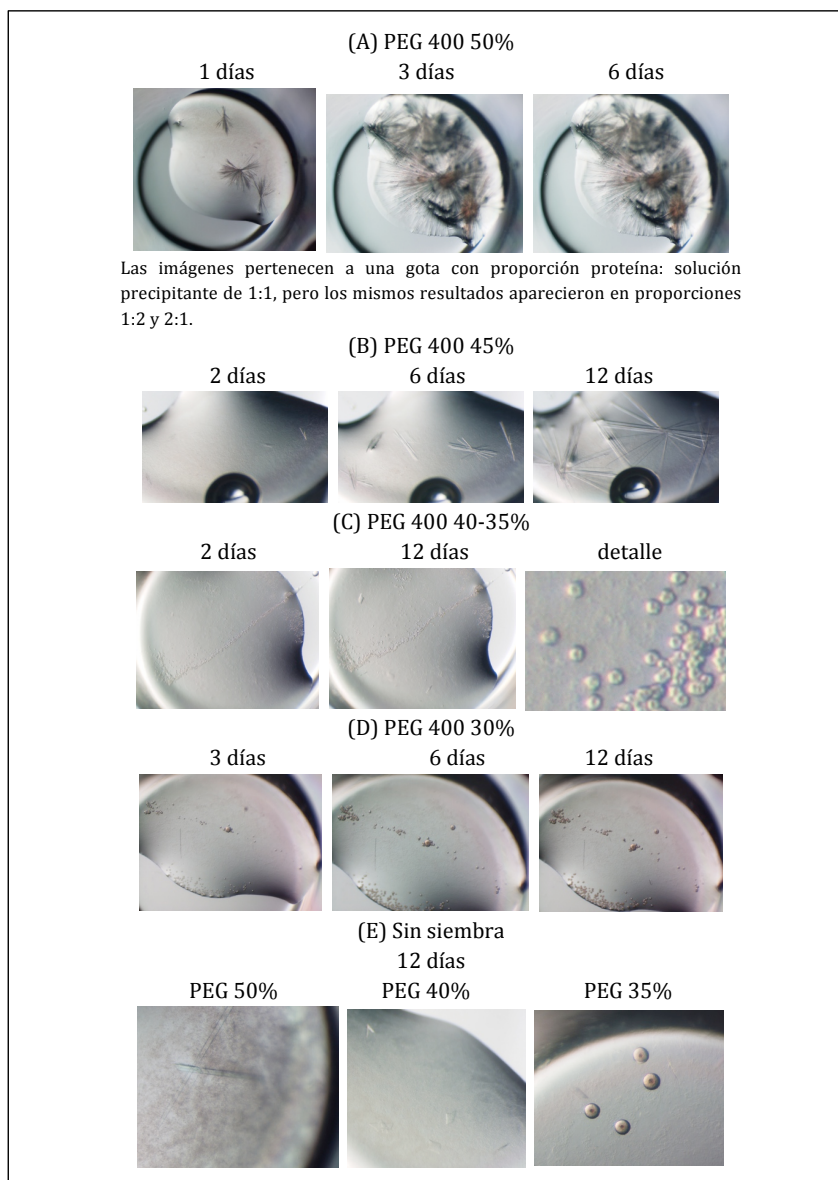


Figura 33: Resultados de optimización de la cristalización de la esterasa desglicosilada. Las imágenes se corresponden con las gotas con proporción 2:1 de proteína:solución precipitante, a no ser que se indique lo contrario.

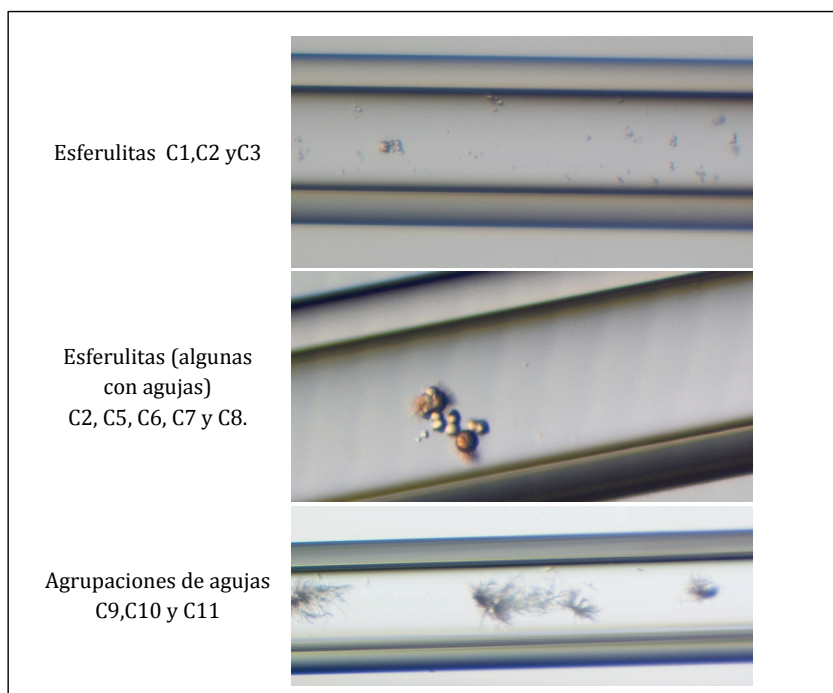


Figura 34: Resultados de optimización de la cristalización en capilares (Tabla 13) con la esterasa desglicosilada (Fig. 22, L5).

Esterasa mutante sin dianas de glicosilación

Para realizar los ensayos de optimización con esterasa mutante (Fig. 22, L7) se partió de la condición del kit comercial JBS PACT++ donde habían salido agujas más rápidamente y con mejor aspecto: sulfato del litio 0.2 M, tampón acetato sódico 0.1 M pH 4.5 y PEG 400 50% (Fig. 32A). El sulfato de litio se substituyó por acetato de litio. Se estudió el efecto sobre el proceso de cristalización de la concentración del agente precipitante PEG 400 (Tabla 15, caja 1), de distintos valores de pH (Tabla 15, caja 2), de distintos agentes precipitantes (Tabla 15, caja 3) y de distintas sales (Tabla 15, caja 4).

En cuanto al efecto de la concentración de PEG 400, se observó que a partir del 40% aparecen placas de mayor tamaño según aumenta la concentración (Fig. 35B-D) y también aumenta la presencia de grandes agujas, de modo que a partir de una concentración del 55% tan sólo hay agujas (Fig. 35D-E). Con el tiempo la presencia de agujas aumenta en las gotas de menor concentración (Fig. 35C). En la concentración de 35 % también acaban por salir placas después de 1 mes de incubación (Fig. 35A). No hubo diferencias destacables entre los distintos valores de pH en esta caja.

En cuanto al efecto de distintos valores de pH entre 5 y 8 (Tabla 15, caja 2), sólo se obtuvieron resultados con pH 7 y 8. A pH 7 se obtuvieron placas pequeñas a 40-42% de PEG 400 (Fig. 36A) y placas con agujas a concentraciones de 48-50% (Fig. 36B). A pH 8 se obtuvieron placas a 42-44% de PEG, pequeñas y poco numerosas (Fig. 36C).

Otro factor que se ensayó fue el efecto de distintos agentes precipitantes de bajo peso molecular, MPD y PEG 1500 (Tabla 15, caja 3). Se comprobó que por sí solos no eran capaces de inducir la cristalización de la proteína y que sólo en presencia de PEG 400 se obtenían placas de mayor o menor tamaño. Las placas obtenidas al combinar PEG 400 con estos precipitantes no supusieron una mejora con respecto al empleo de PEG 400 significativa con respecto a las obtenidas únicamente con PEG 400. La combinación con PEG 1500 dió lugar a placas que eran de mayor tamaño que las obtenidas en la combinación con MPD, para la misma concentración de PEG 400, pero también aumentaba la presencia de grandes agujas (Fig. 37).

Tabla 15: Condiciones estudiadas en cajas CombiClover para la optimización de la cristalización de la esterasa mutante sin dianas de glicosilación (Fig. 22, lote 7).

Caja	Agente precipitante	Sales	Tampón	Resultados positivos
Caja 1	PEG 400 (35-60%)	Acetato de litio 0.2 M	Acetato sódico 0.1 M pH 4-5.5	Placas grandes por encima de 40% de PEG 400, con agujas abundantes a partir de 50%.
Caja 2	PEG 400(40-50%)	Acetato de litio 0.2 M	Acetato sódico 0.1 M pH 5 MES 0.1 M pH 6 HEPES 0.1 M pH 7 Tris/HCl 0.1 M pH 8	Placas pequeñas y agujas a pH 7 y 8,
Caja 3	MPD (35-60 %) PEG 1500 (20-30 %) PEG 400 (35-45 %)+MPD 5% PEG 400 (35-45 %)+PEG 1500 5%	Acetato de litio 0.2 M	Acetato sódico 0.1 M pH 5	Placas sólo en presencia de PEG 400, de mayor tamaño con PEG 1500 que con MPD, también más agujas.
Caja 4	PEG 400 (40-50%)	Acetato de litio 0.2 M LiNO ₃ 0.2 M LiCl ₂ 0.2 M Tartrato K-Na 0.2 M	Acetato sódico 0.1 M pH 5	Con todas las sales hay placas y agujas.
Caja 5	PEG 400 (34-44%)	Acetato de litio 0.2 M	Acetato sódico 0.1 M pH 5	Placas en la línea de siembra para concentraciones de PEG 400 40% o superiores

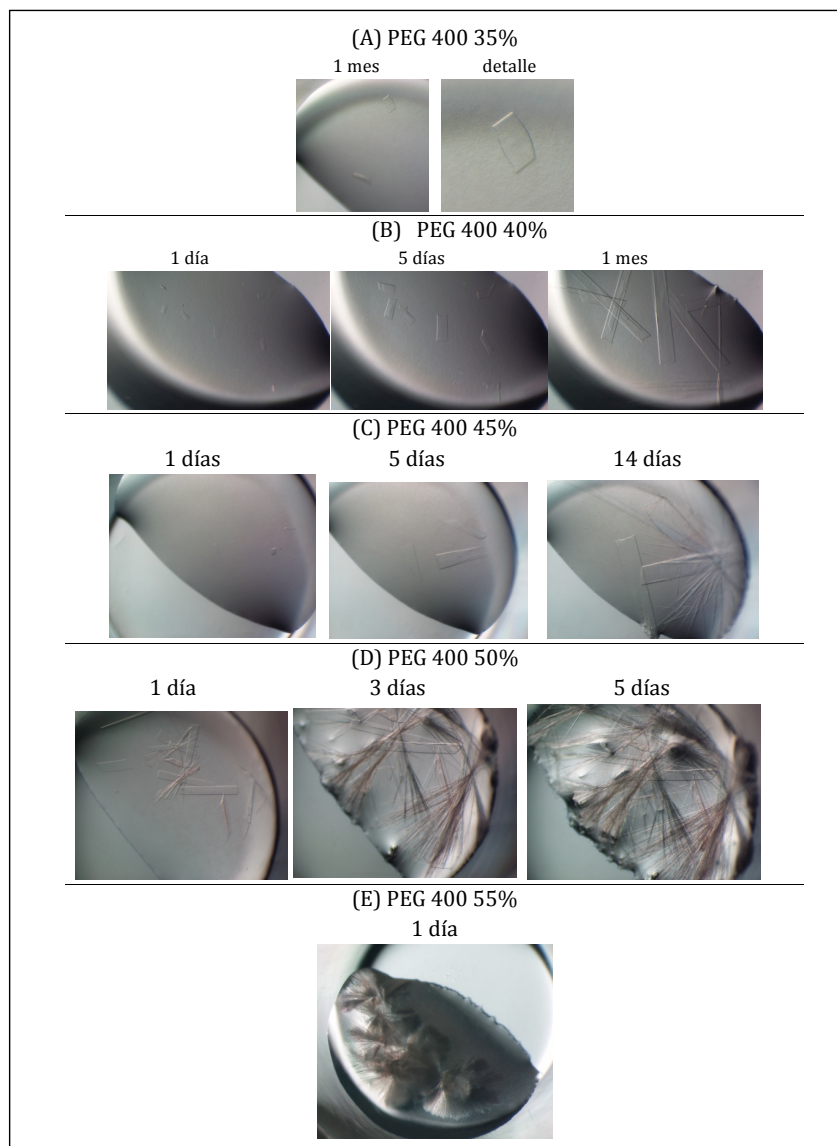


Figura 35: Resultados de optimización de la cristalización de la esterasa mutante según las condiciones de la caja 1 (Tabla 15, caja 1).

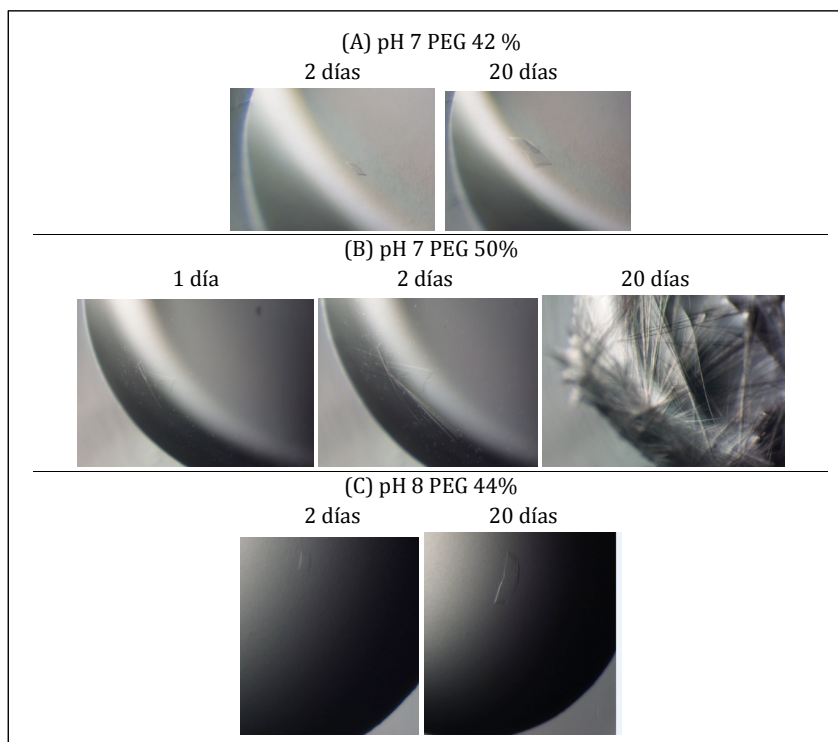


Figura 36: Resultados de optimización de la cristalización de la esterasa mutante (Tabla 15, caja 2).

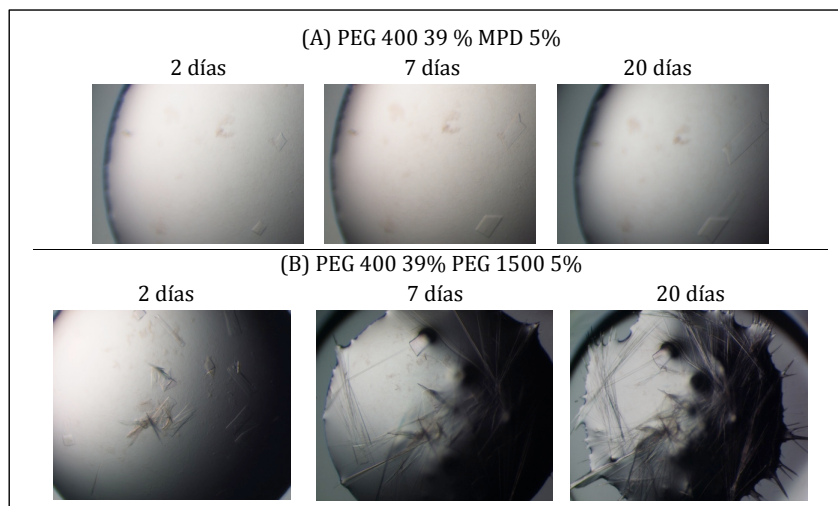


Figura 37: Resultados de optimización de la cristalización de la esterasa mutante (Tabla 15, caja 3).

En cuanto al efecto de las sales para promover la cristalización, se realizaron pruebas con sales de litio (Tabla 15, caja 4), diferentes al acetato de litio empleado en las otras cajas (Tabla 15, cajas 1-3) y mostraron resultados similares. A bajas concentraciones de PEG 400 se observaron placas de pequeño tamaño, y a medida que aumenta la concentración aumenta el tamaño de las placas y la aparición de agujas de gran tamaño (Fig. 38).

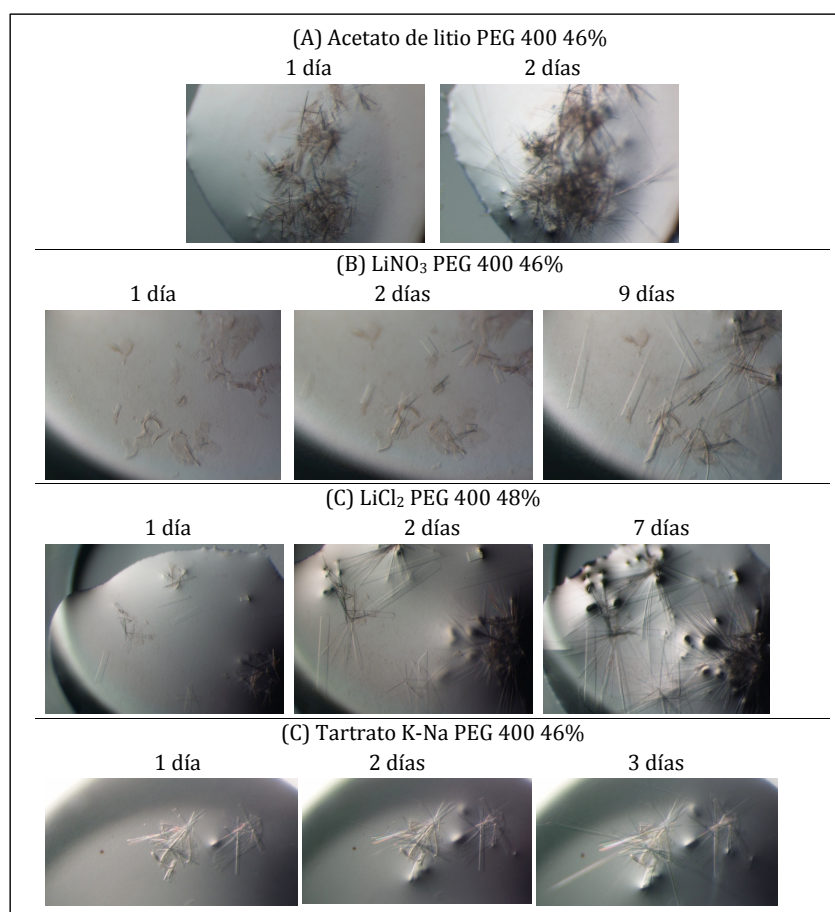


Figura 38: Resultados de optimización de la cristalización de la esterasa mutante (Tabla 15, caja 4).

El último experimento realizado con la esterasa mutante fue una siembra de núcleos cristalinos poniendo una caja con las condiciones diseñadas a partir de los mejores resultados de la caja 1 (Tabla 15, Fig. 35B) donde las placas tenían mejor aspecto y no había agujas y la gota estaba clara, sin precipitado (Tabla 15, caja 5). Se obtuvieron

placas en la línea de siembra a concentraciones entre 40-42% de PEG 400, de mayor tamaño a mayor concentración de agente precipitante (Fig. 39).

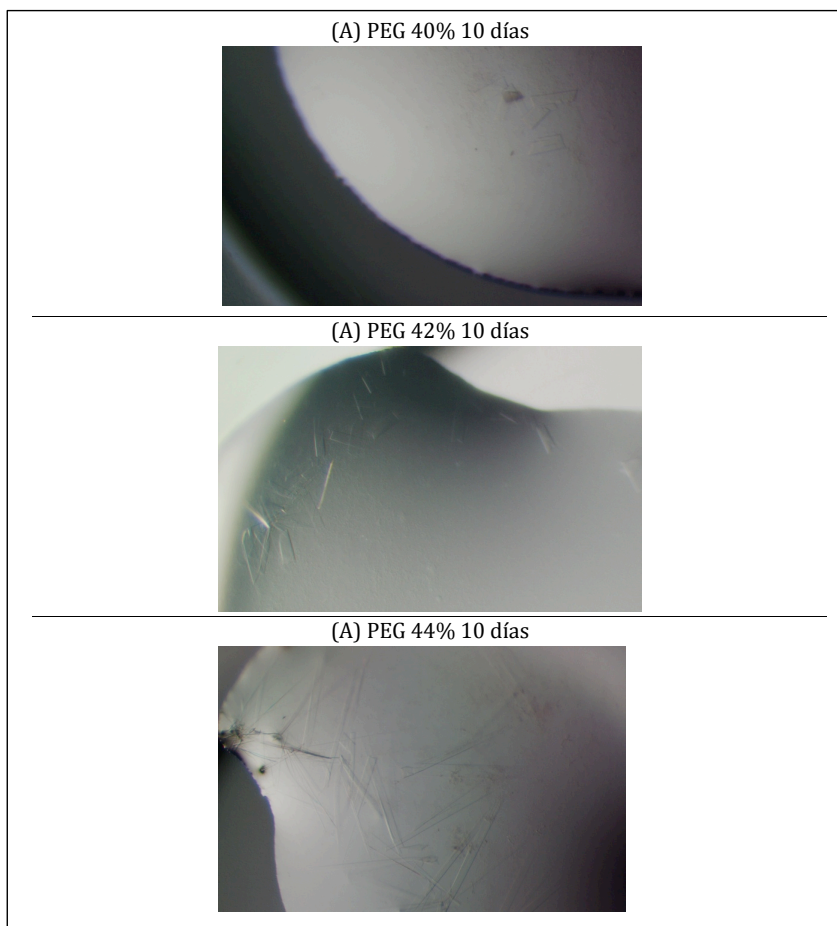


Figura 39: Resultados de optimización de la cristalización de la esterasa mutante por siembra (Tabla 15, caja 5).

3.2.6.4 Conclusiones de los experimentos de cristalización

La glicosilación parece ser un impedimento para la cristalización de esta proteína. Los mejores resultados se obtuvieron con la esterasa mutante, llegando a conseguir placas en pocos días. El siguiente paso sería continuar con la optimización. Se podría intentar reducir la velocidad de cristalización, ya que los cristales que se forman rápidamente

podrían presentar aberraciones más fácilmente que aquellos que van creciendo a un ritmo más lento.

En el caso de la esterasa desglucosilada, partiendo de unos agregados irregulares se ha conseguido obtener agujas grandes y muy gruesas (Fig. 33B), que constituyen un punto de partida para continuar la optimización para la obtención de cristales de mayor calidad.

Nuestro método de purificación, la cromatografía de inmunoafinidad para proteínas con el péptido FLAG rinde proteínas de alto grado de pureza pero no en grandes cantidades, lo que ha limitado el número de experimentos que se han realizado. Una alternativa a este sistema de purificación sería el cambio de péptido etiqueta por cola poli-His, para poder obtener un mayor rendimiento en la purificación de la proteína, y poder ensayar un mayor número de condiciones con cada lote de proteína purificada.

3.3 Lipasa putativa de *T. thermophilus*

3.3.1 Caracterización in silico

La lipasa putativa de *T. thermophilus* HB27 (YP_005592.1) es una proteína intracelular y fue seleccionada por ser la única anotada como lipasa putativa dentro del genoma de dicho microorganismo. Además, su pequeño tamaño podría ser interesante, por ejemplo, en aplicaciones de cosmética, ya que podría favorecer su penetración en la piel.

El análisis de la secuencia de la lipasa putativa con herramientas bioinformáticas reveló unos valores de pI y peso molecular teóricos de 9.9 y 18 kDa respectivamente. No se encontraron ninguna diana de glicosilación ni señal de secreción en su secuencia. El valor GRAVY para esta proteína era de 0.96, lo cual se corresponde con una proteína ligeramente hidrofóbica.

En la búsqueda BLAST de proteínas con homología de secuencia con la lipasa putativa encontramos una proteína con la misma secuencia pero anotada como putativa hidrolasa de la superfamilia HAD de *T. thermophilus* HB8 (gi:55980332). Con una alta identidad, 125/157, (79%) se encontraba una fosfatasa de la superfamilia HAD (subfamilia IIIA) de *T. aquaticus* Y51MC23 (gi:218296021, 160 aa). En segundo lugar, con una identidad menor, 74/151 (49%), se encuentra una proteína no caracterizada de *Deinococcus radiodurans* (gi: 15806963, 174 aa). Y en tercer y cuarto lugar (con una identidad de 47 y 42% respectivamente) dos fosfatasas de la superfamilia HAD, subfamilia IIIA, una de *Deinococcus geothermalis* (gi:94984370, 166 aa) y otra de *Moorella thermoacetica* (gi:83590402, 173 aa). La lipasa putativa posee un dominio conservado de la superfamilia de las hidrolasas de tipo haloácido dehalogenasas (tipo HAD), que se caracterizan por utilizar un aspartato en su sitio catalítico para el ataque nucleófilo del grupo fosfato y también una serina o treonina conservadas con

importantes funciones catalíticas. En la Fig. 40 se señala la presencia de los motivos conservados característicos de las fosfatasa dependiente de Mg^{2+} de la superfamilia HAD sobre la secuencia de la lipasa putativa.

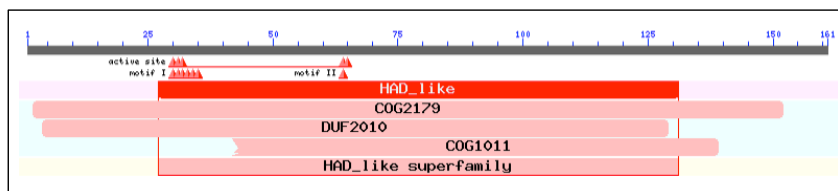


Figura 40: Dominios conservados presentes en la secuencia de la lipasa putativa de *T. thermophilus* HB27.

Las enzimas de la familia V de la clasificación de enzimas lipolíticas bacterianas (Arpigny & Jaeger, 1999) muestran una alta similitud de secuencia con enzimas dehalogenasas y haloperoxidasas, por lo que esta proteína podría tratarse de una enzima lipolítica perteneciente a esta familia.

3.3.2 Comprobación de transformantes

Una vez realizada la transformación en *S. cerevisiae* BJ3505, la actividad lipolítica de los transformantes no pudo ser detectada mediante el método estándar de medida de la actividad lipolítica. Por tanto, se seleccionaron al azar cinco candidatos y se realizaron extracciones de ADN plasmídico de las levaduras, se propagaron los plásmidos en *E. coli* ECOS Blue y se realizaron nuevas extracciones de ADN plasmídico que se enviaron al servicio de secuenciación del SAI de la UDC para confirmar la corrección de las contrucciones por secuenciación. Una vez confirmada la secuencia, la cepa productora de la lipasa recombinante se denominó ScTTL5.4-0.

3.3.3 Producción de la lipasa recombinante

Para comprobar si el sistema de expresión estaba sintetizando y secretando la enzima de manera efectiva se analizaron muestras de medio extracelular concentrado y extracto crudo proteico mediante SDS-PAGE y Western blot, con anticuerpos específicos para detectar el péptido FLAG del extremo aminoterminal. Se detectó la presencia de la proteína recombinante tanto en el medio extracelular como en los extractos proteicos preparados a partir de las células de levadura, confirmando la presencia de la enzima en los cultivos a pesar de la escasa actividad lipolítica detectada en la comprobación de candidatos (Fig. 41).

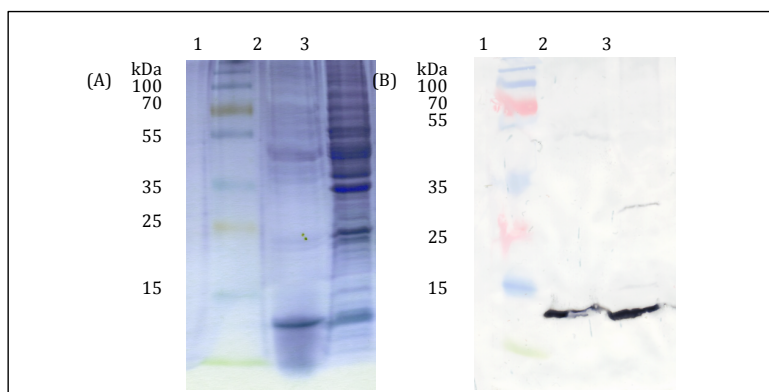


Figura 41: (A) SDS-PAGE del sobrenadante concentrado y extracto crudo de un cultivo de la cepa productora de la lipasa recombinante teñido con Azul de Coomassie. (B) Western Blot con anticuerpo anti-FLAG. Contenido de los carriles: (1) 3 μ L marcador de pesos moleculares PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas); (2) 6 μ L medio extracelular concentrado 15X; (3) 6 μ L extracto crudo.

3.3.4 Caracterización bioquímica

Una vez confirmada la presencia de la putativa lipasa en el medio extracelular se realizó una búsqueda de condiciones óptimas (pH, temperatura y tipo de sustrato) para medir la actividad de dicha enzima, pero no se obtuvieron valores de actividad relevantes que fueran superiores a los de la cepa de la levadura control (sin transformar) (Tabla 16).

La búsqueda de secuencias homólogas por BLAST a la secuencia de la lipasa putativa YP_005592.1 mostró una serie de proteínas similares que se encuentran dentro de la superfamilia HAD, en concreto, fosfatasa. Ante la falta de actividad lipolítica se comprobó la actividad fosfatasa en esta enzima, realizando un ensayo con un sustrato general, el pNPP (p-nitrofenil fosfato). En las condiciones ensayadas, pH 8 y 60°C, se observó que la actividad producida por la cepa recombinante era tres veces superior a la detectada en la cepa sin transformar (Tabla 16). Por tanto, es posible que esta enzima sea una fosfatasa, como indica su similitud de secuencia con enzimas de la superfamilia HAD. Existen una gran variedad de especificidades dentro de esta familia de fosfatasas (Leone *et al.*, 2008) y no todas tienen actividad frente a un sustrato general como es el *p*-nitrofenol fosfato (Hyun *et al.*, 2008). La baja actividad fosfatasa de esta enzima podría deberse a que no se ha ensayado con su sustrato natural.

Esta enzima ha sido recientemente clonada y expresada en *E. coli* por otro grupo (Song *et al.*, 2013). La actividad lipolítica fue caracterizada empleando pNP12 como sustrato a 25°C, pero los resultados de actividad publicados son valores relativos, por lo que no disponemos de datos absolutos con los que poder comparar nuestros resultados, aunque nos informan de que la enzima muestra una actividad óptima a 65°C y pH 8.0

(Song *et al.*, 2013). No obstante, estos datos no excluyen la posibilidad de que la enzima presente actividad fosfatasa.

Tabla 16: Resultado de los ensayos de actividad realizados con la enzima recombinante lipasa putativa. Como control se empleó medio de cultivo de la cepa *S. cerevisiae* BJ3505 sin transformar. Los valores se corresponden con la media \pm la desviación estándar, N=2.

Ensayos de actividad con la proteína TTL							
BJ (control)				TTL5.4			
U/L ± DE				U/L ± DE			
Actividad lipolítica							
pH óptimo							
Acetato/acético	4.5	13.449	±	1.384	14.101	±	1.384
	5	13.195	±	3.384	11.455	±	0.718
	5.5	14.754	±	1.999	15.878	±	6.152
Tris/maleico	6	14.283	±	1.435	17.074	±	8.561
	6.5	18.560	±	3.486	15.479	±	0.564
	7	13.594	±	0.359	11.056	±	0.564
	7.5	23.345	±	3.691	16.313	±	7.997
Tris/HCl	7.5	18.995	±	5.742	12.289	±	1.794
	8	11.854	±	1.999	9.896	±	0.974
	8.5	10.730	±	2.973	8.990	±	1.230
Tª óptima							
	40	14.645	±	0.000	17.908	±	5.229
	50	20.735	±	5.229	19.901	±	5.793
	60	15.624	±	1.692	23.490	±	1.846
	70	17.291	±	1.692	22.366	±	2.922
	85	23.273	±	0.820	33.024	±	1.794
Especificidad de sustrato							
	pNP6	18.850	±	3.332	19.104	±	0.103
	pNP8	15.968	±	0.333	19.104	±	0.103
	pNP12	4.821	±	0.513	5.075	±	0.154
Actividad fosfatasa							
pH 8, 60°C		10.827	±	0.819	32.400	±	2.596

3.4 Genoteca de *T. thermophilus* HB27 y búsqueda funcional

3.4.1 Construcción de la genoteca de *T. thermophilus* HB27 en pCC1FOS

El intento realizado en este trabajo de expresión de una proteína seleccionada únicamente según predicciones bioinformáticas no dió lugar a una enzima activa. Sin embargo, la esterasa, cuya identidad como enzima lipolítica ya teníamos confirmada, sí que pudo ser expresada y caracterizada exitosamente. Como método alternativo se construyó una genoteca de *T. thermophilus* HB27 para realizar una búsqueda funcional,

y poder revelar directamente aquellas enzimas lipolíticas que puedan ser expresadas en forma activa en *E. coli*, sin tener que basarnos en predicciones bioinformáticas. Este enfoque nos daría además la posibilidad de encontrar alguna enzima lipolítica que no haya sido anotada como tal.

Para ello se realizó una extracción de ADN genómico de *T. thermophilus* HB27 por el método CTAB. Se estimó la concentración del ADN purificado con el Nanophotometer y se obtuvo un valor de 183 ng/ μ L ($R_{260/280}=2.128$; $R_{260/230}=2.245$). Una electroforesis de ADN en gel de agarosa mostró que una gran cantidad de este ADN formaba una banda del tamaño deseado (Fig. 42). Por tanto se empleó directamente el ADN para la construcción de la genoteca con el fósido pCC1FOS.

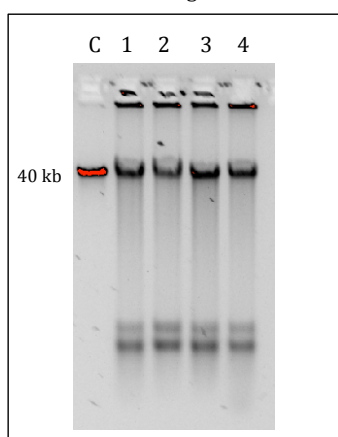


Figura 42: (C) 0.25 μ L ADN Control 40 kb (Epicentre) + 3.75 μ L H₂O + 1 μ L GelGreen. (1,2,3,4) 4 μ L ADN genómico *T. thermophilus* HB27 + 1 μ L GelGreen. Se empleó la extracción número 3.

Una vez obtenida la genoteca en fagos, se realizó una titulación para determinar la dilución del empaquetamiento más adecuada para infectar las células EPI300-T1^R al obtener la genoteca. Los resultados obtenidos (Tabla 17) mostraron que no era necesario diluir el empaquetamiento.

Tabla 17: Titulación de la genoteca

Dilución	Recuento de colonias
0	116
1:10	18
1:100	1
1:1000	0

Además estos datos nos sirven para medir la eficiencia del proceso de construcción de la genoteca, ya que si 10 μ L pueden generar 116 clones, el total de 500 μ L de los que consta la genoteca generaría $5.8 \cdot 10^3$ clones, lo que se sitúa dentro del rango esperado en el kit (10^3 - 10^6 clones por reacción de ligamiento, según la calidad del ADN empleado).

Antes de producir la librería genómica por infección de EPI300-T1^R, necesitamos determinar el tamaño de la librería que queremos obtener, para lo que empleamos la ecuación descrita en Materiales y Métodos:

$$N = \ln (1-P) / \ln (1-f)$$

Para una probabilidad del 99% de encontrar cualquier secuencia del genoma en la librería (P=0.99), siendo el tamaño del genoma de *T. thermophilus* HB27 de 1.89 Mpb (Henne *et al.*, 2004) y el tamaño de los insertos de 40 kb, el tamaño de la librería debería ser de 205 clones. Sabiendo el número mínimo de clones que se debería obtener, se construyó una librería de 5 veces este tamaño, aproximadamente 1000 clones.

$$N = \ln (1-0.99) / \ln (1-[4*10^4/1.89*10^6]) = -4.61 / -0.02 = 205 \text{ clones}$$

3.4.2 Búsqueda funcional de enzimas lipolíticas en la librería genómica

Los clones de la genoteca fueron explorados para buscar actividad lipolítica en placas con medio LB-tributirina suplementadas con cloranfenicol. Tras 48 h de incubación de los clones a 37°C se detectaron dos clones que producían halos claros de hidrólisis, que se denominaron FOS1lip y FOS2lip. La incubación a 65°C no reveló nuevos positivos.

3.4.3 Análisis de los clones positivos

Los clones se cultivaron para inducir la replicación de los fósmodos y poder realizar extracciones de los fósmodos con *FosmidMAX™ DNA Purification Kit* (Epicentre). Para ello se realizaron cultivos con LB-cloranfenicol de 2 mL a los que se añadió el volumen apropiado de una solución incluida en el kit, 500x *CopyControl Fosmid Autoinduction* que provoca la replicación multicopia del fósmodo mediada por oriV mediante la inducción de la expresión del gen *trfA* aportado por la cepa EPI300-T1^R. Estos cultivos se inocularon con una pequeña cantidad de células de cada clon, procedentes de un cultivo fresco en placa, y se dejaron crecer 17 horas a 37°C bajo agitación. Se realizó la extracción de ADN fósmodico siguiendo las instrucciones del kit y la concentración de ADN se cuantificó con el Nanophotometer (Tabla 18).

Tabla 18: Datos de concentración y pureza de las extracciones de fósmodos

	µg/ µL	R _{260/280}	R _{260/230}
FOS1lip	1.598	2.173	2.221
FOS2lip	1.058	1.914	1.986

Se secuenciaron ambos extremos de los insertos con los cebadores T7 y pCC1FOS_Rev (Tabla 6) para identificar la secuencia clonada, y poder deducir cual podría ser la secuencia responsable de la actividad lipolítica. Se realizaron búsquedas BLAST de las secuencias de ambos extremos, y se revisaron manualmente las regiones del genoma de *T. thermophilus* HB27 (NC_005835) con las que se corresponden, sabiendo así cual es la región clonada en cada uno de los clones.

El clon FOS1lip contenía el fragmento del genoma de *T. thermophilus* HB27 entre las posiciones 850604-887577, con una longitud de 36973 pb. El clon FOS2lip contenía el fragmento del genoma de *T. thermophilus* HB27 entre las posiciones 857417-887763, con una longitud de 30346 pb. La región común de los insertos de los clones positivos corresponde con la parte del genoma que se sitúa entre las posiciones 857417-887577 pb. En la Tabla 19 se recoge la lista de los genes anotados en el genoma de *T. thermophilus* HB27 en dicha región. La única secuencia que codifica para una enzima con actividad lipolítica es la esterasa putativa identificada por (Fuciños *et al.*, 2005), y que coincide con la esterasa que se ha expresado con éxito en este trabajo, el gen del locus TTC0904.

Tabla 19: Lista de loci identificados en la secuencia del inserto presente en los clones positivos.

Locus	Posición	Gen	Producto	Número E.C.
TT_C0884	856549..858495		Acetil-coenzima A sintetasa	6.2.1.1
TT_C0885	858629..861166		Acetil-coenzima A sintetasa	6.2.1.1
TT_C0886	861144..863027		Acetil-coenzima A sintetasa	6.2.1.1
TT_C0887	863091..866084	<i>secA</i>	Acetil-coenzima A sintetasa	6.2.1.1
TT_C0888	866226..867197		Posible glicoproteasa	
TT_C0889	867233..868549		Proteína hipotética	
TT_C0890	868557..868982		Putativa reductasa unión Fe-S	
TT_C0891	868990..869199		Proteína hipotética	
TT_C0892	869196..869519		Proteína hipotética conservada	
TT_C0893	869537..871723		Probable helicasa lhr ATP-dependiente	3.6.1.-
TT_C0894	871729..872130		Proteína hipotética	
TT_C0895	872133..874742		Proteína hipotética	
TT_C0896	874715..876487		ADN primasa	2.7.7.-
TT_C0897	876484..877986		4- α -glucanotransferasa	2.4.1.25
TT_C0898	878075..878947		3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	1.1.1.157
TT_C0899	878968..879822		Proteína transmembrana hipotética	
TT_C0900	879812..881032		Zinc proteasa	3.4.-.-
TT_C0901	881025..882236		Zinc proteasa	3.4.-.-
TT_C0902	882252..884564	<i>recG</i>	ADN helicasa recG	3.6.1.-
TT_C0903	884564..885340		Proteína hipotética	
TT_C0904	885294..886283		Putativa esterasa	
TT_C0905	886376..887047		Subunidad D, ATP sintasa tipo V de sodio	3.6.3.15
TT_C0906	887058..888494		Subunidad B, ATP sintasa tipo V de sodio	3.6.3.15

En un experimento similar, pero con una genoteca en plásmidos, se realizó la búsqueda de proteínas lipolíticas en *Thermus scotoductus* SA-01 empleando tributirina como sustrato (Du Plessis *et al.*, 2010). Se detectó una nueva enzima, Est1, perteneciente a una nueva familia de enzimas lipolíticas, con un 76% de identidad de secuencia con una putativa hidrolasa de *T. thermophilus* HB27, situada en el locus TT_C0341 de su genoma. Pero ninguna enzima similar ha sido detectada en nuestro estudio. En *T. thermophilus* HB27 se ha realizado un análisis de mutaciones *in vivo*, interrumpiendo 10 ORFs que codificarían para enzimas lipolíticas y se ha estimado que un 75% de la actividad

lipolítica de esta cepa está codificada por los cuatro loci: TT_C0904 (correspondiente a la esterasa clonada en este trabajo), TT_C1787 (que codifica para una carboxilesterasa) y TT_C0340-1 (Leis *et al.*, 2014). Sólo uno de ellos ha sido detectado en nuestra genoteca, lo cual podría significar que es el único que es compatible con la maquinaria de expresión de *E. coli*.

Por tanto, los resultados de la búsqueda en la genoteca no permiten concluir que el genoma de *T. thermophilus* HB27 no codifique para más enzimas lipolíticas a parte de la que se ha detectado. Puede que, o bien no han sido detectadas por el método empleado (por ejemplo, por no ser activas frente al sustrato empleado), o bien su expresión no sea compatible con la maquinaria de expresión de proteínas de *E. coli*, lo que suele ocurrir con un 20% de las ORFs de cualquier genoma (Jenney Jr. & Adams, 2008). Cuando se trata de proteínas termófilas, se ha estimado que un 40% no pueden ser expresadas de forma activa en hospedadores mesófilos, ya sean bacterias o levaduras (Jenney Jr. & Adams, 2008). Afortunadamente están surgiendo nuevas estrategias de búsqueda continuamente. Hoy en día existe la posibilidad de realizar genotecas y metagenotecas empleando *T. thermophilus* como hospedador, y en concreto existe una cepa deficiente en esterases, diseñada en el estudio mutacional citado anteriormente (Leis *et al.*, 2014), que podría servir para futuros experimentos de expresión y búsqueda de proteínas lipolíticas termófilas.

4. Conclusiones

En este trabajo se han clonado dos enzimas lipolíticas de *T. thermophilus* HB27 empleando el sistema de expresión de la levadura *S. cerevisiae* BJ3505 y el plásmido YEPFLAG-1.

La primera de ellas, la esterasa YP 004578 fue la única que se expresó de manera funcional y mostró altos niveles de actividad lipolítica en el medio extracelular alcanzando una producción de actividad lipolítica 10 veces mayor que la de cultivos de *T. thermophilus* HB27, a pesar de que más del 80% de la producción permanecía retenida en el espacio periplásmico. La esterasa recombinante mostró preferencia por sustratos de cadena lateral de longitud media al igual que la enzima nativa y pH alcalino, pero mayor termoestabilidad a 85°C (vida media 4h y 20 min) en ausencia de CHAPS y menor temperatura óptima (40°C), posiblemente como consecuencia de diferencias en el plegamiento debido a la delección de su extremo amino terminal.

Los datos de actividad de la lipasa putativa YP 005592 y la similitud con fosfatasa de la superfamilia HAD sugieren que podría tratarse de una fosfatasa anotada erróneamente como una lipasa en el genoma de *T. thermophilus* HB27. La expresión y secreción de la enzima se confirmó mediante SDS-PAGE y Western blot pero no se detectó actividad

lipolítica en el medio extracelular de los cultivos de expresión. Sin embargo, sí que se detectó actividad fosfatasa que triplicó a la presentada por la cepa control.

Los experimentos de cristalización preliminar han señalado la esterasa recombinante mutante, sin dianas de glicosilación, como la variante más prometedora para la obtención de cristales. Se ha conseguido obtener placas de gran tamaño, a partir de las cuales se podría continuar el proceso de optimización para la conseguir cristales de alta calidad, aptos para difracción por Rayos X, en presencia de PEG400 40-42% y acetato de litio 0.2 M.

Por otra parte, la construcción de una genoteca de *T. thermophilus*, empleando el fósido pCC1FOS como vector y *E. coli* como hospedador, y la exploración de sus clones mediante búsqueda funcional de actividad lipolítica no ha permitido detectar nuevas enzimas lipolíticas. Los clones positivos obtenidos expresaban la esterasa YP 004578 que ya había sido clonada y expresada en forma activa en *S. cerevisiae*, la cual podría tratarse de la única enzima de dicho microorganismo cuya expresión a partir de su promotor nativo fuera compatible con la maquinaria de expresión de *E. coli*.

5. Referencias

Almeida, R.V., Alquéres, S.M.C., Larentis, A.L., Rössle, S.C., Cardoso, A.M., Almeida, W.I., et al. (2006). Cloning, expression, partial characterization and structural modeling of a novel esterase from *Pyrococcus furiosus*. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (5): 1128-1136.

Altschul, S.F. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-410.

Arpigny, J.L., Jaeger, K.-E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. *Biochemical Journal* 343 (1): 177-183.

Bendtsen, J.D., Dyrlov Bendtsen, J., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* 340 (4): 783-795.

Berger, J.-L., Lee, B.H., Lacroix, C. (1995). Identification of new enzyme activities of several strains of *Thermus* species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44 (1-2): 81-87.

Bernfeld, P. (1951). Enzymes of starch degradation and synthesis. *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry* 12: 379-428.

Bjornsdottir, S.H., Petursdottir, S.K., Hreggvidsson, G.O., Skirnisdottir, S., Hjorleifsdottir, S., Arnfinnsson, J., et al. (2009). *Thermus islandicus* sp. nov., a mixotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from the Torfajokull geothermal area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (12): 2962-2966.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248-254.

Cava, F., Hidalgo, A., Berenguer, J. (2009). *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles* 13 (2): 213-231.

Deive, F.J., Carvalho, E., Pastrana, L., Rúa, M.L., Longo, M.A., Sanromán, M.A. (2009a). Assessment of relevant factors influencing lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in laboratory-scale bioreactors. *Chemical Engineering and Technology* 32 (4): 606-612.

Deive, F.J., Carvalho, E., Pastrana, L., Rúa, M.L., Longo, M.A., Sanromán, M.A. (2009b). Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27. *Bioresource Technology* 100 (14): 3630-3637.

Domínguez, A., Sanromán, A., Fuciños, P., Rúa, M.L., Pastrana, L., Longo, M.A. (2004). Quantification of intra- and extra-cellular thermophilic lipase/esterase production by *Thermus* sp. *Biotechnology Letters* 26 (9): 705-708.

Domínguez, A., Pastrana, L., Longo, M.A., Rúa, M.L., Sanromán, M.A. (2005). Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 26 (2-3): 95-99.

Domínguez, A., Fuciños, P., Rúa, M.L., Pastrana, L., Longo, M.A., Sanromán, M.A. (2007). Stimulation of novel thermostable extracellular lipolytic enzyme in cultures of *Thermus* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2): 187-194.

Domínguez, A., Deive, F.J., Pastrana, L., Rúa, M.L., Longo, M.A., Sanromán, M.A. (2010). Thermostable lipolytic enzymes production in batch and continuous cultures of *Thermus thermophilus* HB27. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 33 (3): 347-354.

Du Plessis, E.M., Berger, E., Stark, T., Louw, M.E., Visser, D. (2010). Characterization of a novel thermostable esterase from *Thermus scotoductus* SA-01: Evidence of a new family of lipolytic esterases. *Current Microbiology* 60 (4): 248-253.

Frankenberg, R.J., Hsu, T.S., Yakota, H., Kim, R., Clark, D.S. (2001). Chemical denaturation and elevated folding temperatures are required for wild-type activity and stability of recombinant *Methanococcus jannaschii* 20S proteasome. *Protein Science* 10 (9): 1887-1896.

Fuciños, P., Abadín, C.M., Sanromán, A., Longo, M.A., Pastrana, L., Rúa, M.L. (2005). Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterisation. *Journal of Biotechnology* 117 (3): 233-241.

Fuciños, P., Rúa, M.L., Longo, M.A., Sanromán, M.A., Pastrana, L. (2008). Thermal spring water enhances lipolytic activity in *Thermus thermophilus* HB27. *Process Biochemistry* 43 (12): 1383-1390.

Fuciños, P., Pastrana, L., Sanromán, A., Longo, M.A., Hermoso, J.A., Rúa, M.L. (2011a). An esterase from *Thermus thermophilus* HB27 with hyper-thermoalkalophilic properties: Purification, characterisation and structural modelling. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 70 (3-4): 127-137.

Fuciños, P., Atanes, E., López-López, O., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I., Pastrana, L., et al. (2011b). Production and characterization of two N-terminal truncated esterases from *Thermus thermophilus* HB27 in a mesophilic yeast: Effect of N-terminus in thermal activity and stability. *Protein Expression and Purification* 78 (2): 120-130.

Glogauer, A., Martini, V., Faoro, H., Couto, G., Müller, M., Monteiro, R., et al. (2011). Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial Cell Factories* 10 (1): 54.

Gómez-Moreno, C., Sancho, J., Avilés, F.X. (2003). *Estructura de proteínas*. Barcelona: Ariel.

Gunther, E.J. (1993). High efficiency, restriction-deficient in vitro packaging extracts for bacteriophage lambda DNA using a new *E. coli* lysogen. *Nucleic Acids Research* 21 (16): 3903-3904.

Henne, A., Brüggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., et al. (2004). The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nature Biotechnology* 22 (5): 547-553.

Hohn, B. (1979). *In vitro* packaging of λ and cosmid DNA. *Methods in Enzymology* 68 (C): 299-309.

Hu, C., Li, L., Zheng, Y., Rui, L., Hu, C. (2011). Perspectives of biotechnological production of L-ribose and its purification. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92 (3): 449-455.

Hyun, S.L., Cho, Y., Lee, J.-H., Sung, G.K. (2008). Novel monofunctional histidinol-phosphate phosphatase of the DDDD superfamily of phosphohydrolases. *Journal of Bacteriology* 190 (7): 2629-2632.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology* 53 (1): 163-168.

Jenney Jr., F.E., Adams, M.W.W. (2008). The impact of extremophiles on structural genomics (and viceversa). *Extremophiles* 12 (1): 39-50.

Jigami, Y., Muraki, M., Harada, N., Tanaka, H. (1986). Expression of synthetic human-lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae*: use of a synthetic chicken-lysozyme signal sequence for secretion and processing. *Gene* 43 (3): 273-279.

Kurosawa, N., Itoh, Y.H., Itoh, T. (2005). *Thermus kawarayensis* sp. nov., a new member of the genus *Thermus*, isolated from Japanese hot springs. *Extremophiles* 9 (1): 81-84.

- Kyte, J.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157 (1): 105-132.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., et al.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21): 2947-2948.
- Leis, B., Angelov, A., Li, H., Liebl, W.** (2014). Genetic analysis of lipolytic activities in *Thermus thermophilus* HB27. *Journal of Biotechnology* 191: 150-157.
- Leone, R., Cappelletti, E., Benvenuti, M., Lentini, G., Thaller, M.C., Mangani, S.** (2008). Structural insights into the catalytic mechanism of the bacterial Class B phosphatase AphA belonging to the DDDD superfamily of phosphohydrolases. *Journal of Molecular Biology* 384 (2): 478-488.
- Liu, J., Yin, M., Zhu, H., Lu, J., Cui, Z.** (2011). Purification and characterization of a hyperthermostable Mn-superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* 15 (2): 221-226.
- López, E., Alonso, B., Deive, F.J., Sanromán, M.A., Longo, M.A.** (2011) On the hyperthermostability of lipolytic enzymes from *Thermus aquaticus* YT-1: Exploring their application to polymer degradation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86 (6): 838-844.
- Lopez, E., Domínguez, B., Deive, F.J., Sanromán, M.A., Longo, M.A.** (2012). Scaling-up the production of thermostable lipolytic enzymes from *Thermus aquaticus* YT1. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35 (6): 1011-1022.
- Marteinsson, V.T., Birrien, J.-L., Raguénès, G., Da Costa, M.S., Prieur, D.** (1999). Isolation and characterization of *Thermus thermophilus* Gy1211 from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles* 3 (4): 247-251.
- McPherson, A.** (2009). *Introduction to Macromolecular Crystallography: Second Edition*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Ming, H., Yin, Y.-R., Li, S., Nie, G.-X., Yu, T.-T., Zhou, E.-M., et al.** (2014). *Thermus caliditerrae* sp. nov., a novel thermophilic species isolated from a geothermal area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(2):650-656.
- Mnisi, S.M., Louw, M.E., Theron, J.** (2005). Cloning and characterization of a carboxylesterase from *Bacillus coagulans* 81-11. *Current Microbiology* 50 (4): 196-201.
- Moore, E., Arnscheidt, A., Krüger, A., Strömpl, C., Mau, M.** (1999). Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Molecular microbial ecology manual* 1 (1): 1-15.

- Oshima, T., Imahori, K.** (1974). Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a nonsporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1974;24(1):102-12.
- Pantazaki, A.A., Pritsa, A.A., Kyriakidis, D.A.** (2002). Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58 (1): 1-12.
- Rajagopala, S., Casjens, S., Uetz, P.** (2011). The protein interaction map of bacteriophage lambda. *BMC microbiology* 11 (1): 213.
- Rao, K., Kumaran, D., Seetharaman, J., Bonanno, J., Burley, S., Swaminathan, S.** (2006). Crystal structure of trehalose-6-phosphate phosphatase-related protein: Biochemical and biological implications. *Protein Science* 15 (7): 1735-1744.
- Rezanka, T., Siristova, L., Sigler, K.** (2011). Rhamnolipid-producing thermophilic bacteria of species *Thermus* and *Meiothermus*. *Extremophiles* 15 (6): 697-709.
- Rocha-Martín, J., Vega, D., Bolivar, J.M., Godoy, C.A., Hidalgo, A., Berenguer, J., et al.** (2011). New biotechnological perspectives of a NADH oxidase variant from *Thermus thermophilus* HB27 as NAD⁺-recycling enzyme. *BMC Biotechnology* 2011;11.
- Singleton, M.R., Littlechild, J.A.** (2001). Pyrrolidone carboxylpeptidase from *Thermococcus litoralis*. *Methods in Enzymology* 330: 394-403.
- Song, C., Sheng, L., Zhang, X.** (2013). Immobilization and Characterization of a Thermostable Lipase. *Marine Biotechnology* 15 (6): 659-667.
- Terpe, K.** (2013). Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (24): 10243-10254.
- Vajna, B., Kanizsai, S., Kéki, Z., Márialigeti, K., Schumann, P., Tóth, E.M.** (2012). *Thermus composti* sp. nov., isolated from oyster mushroom compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62 (7): 1486-1490.
- Verger, R.** (1997). 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends in Biotechnology* 15 (1): 32-38.
- Wilson, K.** (2001). Chapter 2: Preparation of genomic DNA from bacteria in *Current protocols in molecular biology* editado por Frederick M. Ausubel. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA.
- Zhang, X.-Q., Ying, Y., Ye, Y., Xu, X.-W., Zhu, X.-F., Wu, M.** (2010). *Thermus arciformis* sp. nov., a thermophilic species from a geothermal area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (4): 834-839.

CAPÍTULO 2:

Búsqueda de enzimas lipolíticas en aguas termales mediante metagenómica funcional

1. Introducción	125
1.1 Metagenómica	125
1.2 Metagenómica basada en secuencia	125
1.3 Metagenómica basada en función	127
1.4 Técnicas de enriquecimiento	127
1.5 Extracción de ADN metagenómico	128
1.6 Tipos de metagenotecas	129
1.7 Tamaño de metagenotecas de ambientes termales	130
1.8 Precedentes de enzimas lipolíticas descubiertas por metagenómica	131
1.9 Métodos de búsqueda funcional de enzimas lipolíticas	132
1.10 Fuentes termales en Galicia	132
2. Materiales y métodos	133
2.1 Material biológico	133
2.2 Métodos microbiológicos	135
2.3 Técnicas de manipulación de ADN	136
2.4 Detección funcional de actividad lipolítica en las metagenotecas	139
2.5 Identificación de las secuencias responsables de la actividad lipolítica y análisis con herramientas bioinformáticas	141
2.6 Construcción de cepas recombinantes productoras de enzimas lipolíticas	141
2.7 Métodos de extracción de proteínas	142
2.8 Determinación de actividad enzimática	142
2.9 Métodos electroforéticos	143
2.10 Métodos cromatográficos	143
3. Resultados y discusión	143
3.1 Construcción de la metagenoteca de un cultivo de enriquecimiento y búsqueda funcional de actividad lipolítica	144
3.2 Selección, subclonación y análisis de los clones positivos de la metagenoteca enriquecida	146
3.3 Evaluación de la representación del género <i>Geobacillus</i> entre los positivos de la metagenoteca enriquecida	147

3.4 Construcción de la metagenoteca de aguas termales y búsqueda funcional de actividad lipolítica	152
3.5 Selección, subclonación y análisis de la enzima lipolítica del clon FOS 4.	154
3.6 Clonación, expresión heteróloga y caracterización bioquímica de la nueva enzima lipolítica LOB4Est	158
4. Conclusiones	164
5. Referencias	165

1. Introducción

1.1 Metagenómica

La Metagenómica es una disciplina que permite el estudio del conjunto de genomas de una comunidad microbiana prescindiendo de la etapa de cultivo. Por tanto, es una vía de estudio de aquellos microorganismos que no pueden ser cultivados, que suponen la inmensa mayoría en la naturaleza (Amann *et al.*, 1995).

Al hablar un metagenoma, el ADN total de una comunidad microbiana, tenemos que ser conscientes de su magnitud. Se ha estimado que 1 mL de agua marina con 200 especies diferentes supone un metagenoma de alrededor de 1 Gpb de secuencia única, para el que se necesitaría una metagenoteca con 500 Gpb (equivalente a 25 millones de clones de fósido con insertos de 40 kpb), para que incluso los miembros más raros se vieran representados. Y en suelos la riqueza podría ser hasta 20 veces mayor (Riesenfeld *et al.*, 2004). La metagenómica nos da acceso a una vasta diversidad microbiana y proteica, cuyo estudio va avanzando a medida que se desarrollan nuevas metodologías y van siendo accesibles y asequibles para la comunidad científica en general, incluso para los pequeños grupos de investigación. Las aplicaciones prácticas que nos ofrece incluyen una gran variedad de posibilidades, desde la obtención de nuevos y mejores biocatalizadores enzimáticos, ya sean para aplicaciones industriales o biotecnológicas, a la respuesta a problemas actuales como la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos (antibióticos, anticancerígenos e inmunodepresores) (Milshteyn *et al.*, 2014) o la biorremediación (Uhlík *et al.*, 2013; Srivastava *et al.*, 2014).

El objetivo concreto de cada estudio metagenómico determina la estrategia metodológica a emplear. A grandes rasgos, existen dos enfoques posibles dentro de los que agrupar las distintas estrategias, los estudios basados en secuencia y los estudios basados en función.

1.2 Metagenómica basada en secuencia

Una vez extraído el ADN metagenómico, se puede obtener información de su secuencia de diversas formas: hibridación con microarrays para estudiar la diversidad filogenética (genes ARNr como diana) o funcional (para diferentes categorías de genes funcionales); métodos basados en PCR, secuenciando los productos de amplificación generados al emplearlo como molde con cebadores diseñados para genes ARNr 16S, otros genes con información filogenética o genes funcionales; o secuenciación masiva, que permite el estudio más exhaustivo, y el descubrimiento de nuevos filotipos, proteínas, reguladores o rutas metabólicas (Zhou *et al.*, 2015). El avance en la tecnología de secuenciación, cada vez más rápida y asequible, está permitiendo la aparición de un gran número de proyectos que están cambiando la visión que se tiene del universo microbiano. Y aunque

aún se está muy lejos de poder ver los límites de esa diversidad, tanto de taxones filogenéticos como de funciones, secuencias y plegamientos proteicos, el conocimiento adquirido a través de metagenómica está creciendo a un ritmo muy rápido (Godzik, 2011). Y no sólo se estudian los microorganismos, los virus también son objeto de estudio en este campo para desentrañar el papel que juegan en distintos ecosistemas del planeta y la diversidad real en la que están presentes (Schoenfeld *et al.*, 2008)

Según el método de secuenciación empleado, se pueden generar desde decenas de megabases a cientos de gigabases de secuencia en cada proyecto, con lecturas que pueden tener una longitud de unos 35 a 800 pb. Se maneja una gran información de secuencia nueva, que requiere el desarrollo y mejora de algoritmos para el ensamblaje de las lecturas, el análisis y asignación de genomas a grupos filogenéticos, así como la detección y anotación funcional de los genes complemente nuevos (Shokralla *et al.*, 2012). En la web de Genome Database online (GOLD) (Reddy *et al.*, 2015) se recopila información de estudios de secuenciación de metagenomas de todo el mundo. Estos metagenomas proceden de muestras ambientales naturales o alteradas por el hombre, así como de microbiotas de diversos organismos. Por el momento incluye 553 estudios (última consulta Marzo del 2015) en los que se engloban 5836 proyectos de secuenciación.

Una vez obtenida la secuencia de una metagenoteca, los datos pueden ser interpretados para describir la diversidad filogenética y ecológica de una comunidad microbiana, pudiendo descubrirse nuevas especies y proteínas. Así, en un biofilm acidófilo con una baja diversidad, 76 Mpb de secuencia única fueron suficientes para reconstruir dos genomas completos y los flujos metabólicos dentro de la comunidad (Tyson *et al.*, 2004). Pero los estudios se complican a medida que la diversidad se va haciendo mayor. En una muestra de agua del Mar de los Sargazos, que presentaba una alta diversidad, con 1 Gpb de ADN no redundante se obtuvo una cobertura de secuencia pobre, ofreciendo una visión general de la diversidad filogenética y llegándose únicamente a reconstruir dos genomas casi completos (Venter *et al.*, 2004).

En cuanto a la búsqueda de nuevas enzimas, existen principalmente dos estrategias basadas en secuencia. La primera de ellas sería mediante PCR, empleando el ADN metagenómico como molde y un conjunto de oligonucleótidos diseñados de acuerdo con la secuencia aminoacídica conservada de las enzimas de interés. Este método se ha utilizado en lipasas (Bell *et al.*, 2002), pero la mayoría de los genes funcionales con aplicaciones prácticas presentan demasiada divergencia de secuencia para ser detectados por estos métodos (Schloss & Handelsman, 2003). La segunda consistiría en explorar la secuencia de los metagenomas secuenciados mediante búsquedas por homología con enzimas ya conocidas. La búsqueda de enzimas mediante este tipo de estrategias presenta una desventaja, que es la tendencia a detectar únicamente aquellas que están relacionadas con las enzimas ya conocidas, y podría pasar por alto aquellas que presentan secuencias completamente nuevas.

1.3 Metagenómica basada en función

En el enfoque basado en función, se emplea el ADN metagenómico para la construcción de una metagenoteca de expresión, usando en la mayor parte de los casos *E. coli* como hospedador, y se realizan búsquedas funcionales para detectar aquellos clones que presentan la actividad de interés.

Los sistemas empleados para la detección de los clones que expresen la proteína deseada dependerán de su naturaleza: detección fenotípica para aquellas enzimas cuya actividad pueda ser detectada visualmente (ya sean sustratos cromogénicos, insolubles o compuestos coloreados que revelen dicha actividad), complementación heteróloga de la cepa huésped para la detección de genes que confieran resistencia a antibióticos y de otras enzimas (por ejemplo, las DNA polimerasas) o expresión inducida de gen (el ADN metagenómico es clonado aguas arriba de un gen reportero, como la proteína de fluorescencia verde, que se encontrará por tanto bajo la influencia de los promotores del ADN metagenómico, y aquellos clones que contengan genes inducidos por un determinado estímulo serán detectados por fluorescencia (Simon & Daniel, 2011).

Debido a la naturaleza del método empleado, las búsquedas funcionales suelen dar lugar a la identificación de genes funcionales y completos. También tiene la ventaja de que permite la detección de genes con secuencias completamente nuevas. La desventaja que presenta es que el éxito de esta búsqueda depende de la compatibilidad de los genes clonados con la maquinaria de transcripción y traducción del hospedador, normalmente *E. coli*. Además, en el caso de las lipasas, la expresión puede verse dificultada por el requerimiento de chaperonas específicas para su correcto plegamiento o por un efecto tóxico en el hospedador (Gabor *et al.*, 2004). Por otra parte, una vez detectada la enzima, la ausencia de marcadores filogenéticos en el fragmento clonado que contiene el gen dificulta determinar su origen, pero la secuencia puede ofrecer otro tipo de información como el contenido en G/C, el uso de codones o promotores para asignar los genes a determinados filos (Riesenfeld *et al.*, 2004).

En el caso de las lipasas y esterasas, existen distintos métodos de detección disponibles, pero hay muchas otras actividades enzimáticas que no pueden ser detectadas. La metagenómica funcional, en términos generales, tiene un gran capacidad de mejora en este aspecto, que pasa por el diseño de nuevos sistemas de detección que además puedan ser adaptados a sistemas de alto rendimiento, para las aplicaciones en otras enzimas.

1.4 Técnicas de enriquecimiento

En las metagenotecas, la probabilidad de encontrar un clon que contenga el gen que estamos buscando suele ser muy baja, en algunos casos menor del 0.1% (Henne *et al.*, 2000). Para aumentar dicha probabilidad, se pueden utilizar técnicas de

enriquecimiento, que incrementan la proporción de genes de interés en la muestra. Estas técnicas pueden aplicarse bien sobre los microorganismos (como por ejemplo, por medio de filtración selectiva o cultivos de enriquecimiento, donde el crecimiento de determinados microorganismos se ve favorecido) o bien sobre los propios genes o genomas (por ejemplo, empleando sustratos marcados con isótopos estables, para luego seleccionar por centrifugación diferencial los genomas con ADN más “pesado”, correspondiente a aquellos microorganismos que han asimilado dichos compuestos y por tanto presentan una determinada función metabólica) (Cowan *et al.*, 2005).

Los cultivos de enriquecimiento son uno de los métodos más sencillos. Consisten en emplear factores nutricionales, físicos o químicos, para ejercer una presión selectiva sobre el crecimiento de los microorganismos y aumentar la frecuencia de aquellos organismos que presenten una determinada característica. El empleo de un sustrato es el ejemplo más común. De este modo, para seleccionar microorganismos productores de enzimas lipolíticas, se emplearían sustratos lipídicos como única fuente de carbono, siendo el aceite de oliva el más empleado. No obstante, esta preselección se realiza a expensas de una pérdida de biodiversidad, ya que se excluyen los microorganismos que no son cultivables y aquellos de crecimiento lento (Cowan *et al.*, 2005). Para mantener una rica diversidad y no seleccionar únicamente aquellos microorganismos de crecimiento rápido, lo ideal sería realizar cultivos de corta duración y solamente una transferencia a medio fresco (Gabor *et al.*, 2004). Pero también se pueden obtener resultados positivos empleando condiciones muy dispares. Por ejemplo, se han descubierto varias lipasas termófilas nuevas a partir de un cultivo de enriquecimiento en un biorreactor a 50-70°C durante 3 meses (Meilleur *et al.*, 2009; Côté & Shareck, 2010).

Una ventaja añadida del uso de cultivos de enriquecimiento es que facilita en gran medida la extracción de DNA genómico, evitando la contaminación con inhibidores (por ejemplo, ácidos húmicos en el caso de muestras de suelo).

1.5 Extracción de ADN metagenómico

El punto de partida de un estudio metagenómico es la extracción del ADN ambiental o ADN metagenómico. Existen dos tipos de estrategias a seguir: aislamiento de células o lisis directa. En el primero las células se aíslan del sustrato y posteriormente se lisan, mientras que en el segundo las células se lisan directamente en la muestra ambiental. A partir de células aisladas se consigue un ADN más puro, evitando contaminaciones con polifenoles, como los ácidos húmicos, que son difíciles de eliminar e interfirieron en la posterior modificación enzimática del ADN obtenido. Pero algunos microorganismos pueden quedar adheridos o en los intersticios de las partículas de la muestra de modo que la diversidad resultante sería menor que la obtenida mediante lisis directa.

En cuanto a la lisis de las células también hay dos estrategias diferentes: lisis mecánica o química y enzimática. Con la lisis mecánica se considera que se obtiene una muestra más representativa del conjunto de la población microbiana de un determinado ambiente. El empleo de enzimas para la extracción mediante lisis química da lugar a un sesgo hacia determinados grupos de microorganismos, ya que las bacterias Gram + o las arqueas suelen más difíciles de lisar debido a la composición de sus paredes celulares (Riesenfeld *et al.*, 2004). El principal factor a tener en cuenta para la elección del método es el tamaño del ADN metagenómico que se desea obtener. Sólo mediante lisis química y enzimática se obtiene ADN de alto peso molecular, que es necesario para determinadas aplicaciones, como por ejemplo, la construcción de metagenotecas en fósquidos. Mediante lisis mecánica obtendríamos ADN de menor tamaño, apto para secuenciación, PCR y metagenotecas de insertos cortos.

Los ambientes extremos suponen un reto añadido a la hora de extraer ADN metagenómico, ya que en algunos casos los bajos rendimientos de biomasa impiden un alto rendimiento en la obtención de ADN para su clonación (Ferrer *et al.*, 2007). Este problema se puede resolver mediante, por ejemplo, el empleo de muestras de mayor tamaño (como la filtración de un mayor volumen de agua) o la amplificación al azar del metagenoma una vez extraído, por medio de la técnica denominada Amplificación por Desplazamiento Múltiple con la enzima Φ ADN polimerasa (Lewin *et al.*, 2013; Schröder *et al.*, 2014).

1.6 Tipos de metagenotecas

En la construcción de metagenotecas se pueden seguir dos estrategias según el objetivo que se persiga: metagenotecas con insertos cortos (en plásmidos) o metagenotecas con insertos largos (en fósquidos, cósmidos o cromosomas bacterianos artificiales, BACs).

Metagenotecas de insertos cortos (hasta 15 kb)

En la construcción de estas metagenotecas se emplean plásmidos multicopia, cuya eficiencia de transformación suele ser alta, y se pueden obtener 10^5 clones a partir de 3-5 microgramos de ADN metagenómico (Simon & Daniel, 2011). La fragmentación del ADN no es un problema en este caso, por lo que pueden emplearse métodos de lisis mecánicos, de modo que se recupera una mayor diversidad. Estas metagenotecas son útiles para detectar funciones codificadas por un único gen o pequeños operones, o bien para la secuenciación y reconstrucción de metagenomas.

Metagenotecas de insertos largos

En la construcción de estas metagenotecas se emplean fósquidos y cósmidos (hasta 40kb) o cromosomas artificiales de bacterias (más de 40 kb). El tamaño de los insertos es mucho mayor, de manera que se puede abarcar la misma cantidad de información

genética en un menor número de clones que en metagenotecas de insertos cortos. Esto es especialmente útil en el caso de no emplear sistemas de detección de alto rendimiento, ya que al hacerlo de manera manual se disminuye el número de clones que hay que manejar y el número de clones que hay que analizar para obtener un positivo. La transformación con estos vectores suele ser poco eficiente, pero el empleo de fagos para introducir el ADN en las bacterias aumenta la eficiencia de transformación de fósmidos y cósmidos.

La clonación de fragmentos largos permite la posibilidad de recuperar rutas metabólicas completas (Cowan *et al.*, 2005)

Uno de los fósmidos comerciales más empleados es pCC1FOS (Fosmid Library Production Kit, Epicentre), que se vende en forma de kit para la construcción de metagenotecas en *E. coli* a partir de DNA metagenómico fragmentado aleatoriamente de un tamaño de 40 kbp. Se trata de un vector de copia única inducible a multicopia.

Hospedador de metagenotecas

El microorganismo más empleado para la construcción de metagenotecas es *E. coli*. Su maquinaria de transcripción es relativamente promiscua y es capaz de reconocer señales de expresión foráneas, pero tiene sus limitaciones. En torno al 40% de una selección de genes foráneos, clonados bajo el control de su propios promotores, se pudieron expresar correctamente en *E. coli*, aunque con grandes variaciones entre los grupos de organismos de donde procedían los genes (Gabor *et al.*, 2004). Esto es debido a la diversidad que existe de contenido en GC, secuencias señal, sistemas de plegamiento y sistemas de secreción y degradación (Ferrer *et al.*, 2008).

Para superar este problema se han desarrollado sistemas de expresión en otros hospedadores como *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia graminis*, *Caulobacter vibrioides*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia metallidurans*, *Sulfolobus solfataricus*, *Thermus thermophilus* y *Streptomyces* spp. Así se aumenta la probabilidad de éxito en detectar un mayor número de clones positivos en búsquedas funcionales (Kennedy *et al.*, 2011).

1.7 Tamaño de las metagenotecas: ambientes termales

Es difícil predecir el número de clones que son necesarios para construir una metagenoteca que recoja toda la diversidad de un ambiente, si ésta es desconocida. La diversidad en los ambientes termales suele ser relativamente baja, con sólo unos pocos taxones dominantes (Lewin *et al.*, 2013). A veces la elección del número de clones de las metagenotecas para búsqueda funcional atiende a criterios prácticos, como la cantidad de ADN disponible o la capacidad de procesar un bajo o alto número de clones. En la bibliografía nos encontramos con varios ejemplos de metagenotecas construidas a partir de ambientes termales, y el número de clones es muy variable: entre 36000 y 479000

clones en metagenotecas construidas con plásmidos (Tirawongsaroj *et al.*, 2008; Wemheuer *et al.*, 2013), y entre 2880 y 10214 clones en metagenotecas construidas con fósmidos (Wang *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2005).

1.8 Precedentes de enzimas lipolíticas descubiertas por metagenómica

El grupo de las esterasas y lipasas ha sido uno de los que más atención ha recibido en la búsqueda funcional de enzimas por medio de metagenómica, gracias a su abundancia en los microorganismos, su valor comercial y la disponibilidad de métodos de detección simples. Las enzimas normalmente presentan propiedades adaptadas a las condiciones físico-químicas de los hábitat donde viven los microorganismos que las producen. Por tanto, la elección de las muestras para un estudio metagenómico se debería establecer de acuerdo con las características que se deseen encontrar en las enzimas descubiertas.

En los últimos años, se han aislado nuevas enzimas lipolíticas mediante metagenómica, que han ampliado el conocimiento acerca de este tipo de enzimas: enzimas lipolíticas bifuncionales (Beloqui *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011), varias enzimas pertenecientes a familias completamente nuevas (Lee *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009; Faoro *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2012). Las enzimas lipolíticas se buscan en una gran diversidad de ambientes:

- Aguas termales: son la fuente natural por excelencia de enzimas termófilas, que además de presentar actividad a altas temperaturas suelen ser resistentes a solventes orgánicos, detergentes y valores extremos de pH (Haki & Rakshit, 2003). En los últimos años se han descubierto cinco esterasas termoestables con temperaturas óptimas de 70-95°C (Rhee *et al.*, 2005; Tirawongsaroj *et al.*, 2008), una de ellas con marcada actividad también a temperaturas mesófilas (Tirawongsaroj *et al.*, 2008).
- Compost: también es una buena fuente de enzimas termófilas, debido a las altas temperaturas que se alcanzan durante el proceso de compostaje, que puede llegar a 80°C. Recientemente se han aislado varias esterasas, no todas termoestables (Lämmle *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010), pero una de ellas destaca por su estabilidad hasta a 60°C y en solventes orgánicos (Kang *et al.*, 2011).
- Suelos: en los últimos años se han aislado enzimas lipolíticas de características muy variadas, adaptadas al frío (Elend *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Heath *et al.*, 2009; Berlemont *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012; Ko *et al.*, 2012), con una marcada estabilidad en solventes orgánicos (Fan *et al.*, 2011) o termófilas (Faoro *et al.*, 2011; Chow *et al.*, 2012).
- Ambientes marinos: existe una gran diversidad de ecosistemas marinos desde los ambientes costeros hasta las comunidades microbianas asociadas a organismos marinos y fumarolas hidrotermales. Esto supone una gran variedad de condiciones extremas como alta salinidad, alta o baja temperatura, o alta presión. En los últimos años se han descubierto 4 nuevas familias y 1 nueva subfamilia de enzimas lipolíticas bacterianas (Lee *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2008; Kim *et al.*,

2009; Fu *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2012) a parte del descubrimiento de nuevas enzimas pertenecientes a familias ya conocidas.

- Agua de ríos: origen de una enzima lipolítica perteneciente a una nueva familia (Wu & Sun, 2009).

Estos estudios prueban que la metagenómica funcional es una buena estrategia para descubrir nuevas enzimas lipolíticas, que pueden presentar combinaciones únicas de características bioquímicas y usos potenciales en aplicaciones industriales. El hecho de que se hayan descubierto varias nuevas familias de esterasas y lipasas bacterianas en tan sólo unos pocos estudios metagenómicos revela que a pesar del número creciente de este tipo de estudios, la diversidad inexplorada todavía es enorme.

1.9 Métodos de búsqueda funcional de enzimas lipolíticas

El método más común para detectar clones con actividad lipolítica en una metagenoteca es el uso de placas de medio sólido con tributirina emulsificada, en las que la aparición de halos transparentes alrededor de las colonias indica la hidrólisis del sustrato (Lawrence *et al.*, 1967). También se han empleado métodos para detectar específicamente lipasas verdaderas, empleando otros sustratos que no son hidrolizados por las esterasas (trioleína, tricaprilina o aceite de oliva) en presencia de Rodamina B. Este compuesto forma complejos fluorescentes con los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis de los sustratos, que forman halos fluorescentes alrededor de las colonias productoras de enzimas lipolíticas cuando son irradiadas con luz ultravioleta (Kouker & Jaeger, 1987). Menos frecuentemente, las metagenotecas son exploradas empleando sustratos alternativos como α -naftil acetato con Fast Blue R en top agar (detección de halos de color amarillo) (Park *et al.*, 2011; Ferrer *et al.*, 2005) o placas con Tween-20 en presencia de CaCl_2 (detección de halos formados por la liberación de ácidos grasos y formación de sales) (Okamura *et al.*, 2010).

1.10 Fuentes termales de Galicia

La comunidad autónoma de Galicia, en el Noroeste de España, alberga un gran número de manantiales de agua mineral de origen meteórico: la lluvia penetra a través de las fracturas en el subsuelo, por donde circula cambiando su composición química y temperatura antes de emerger en manantiales naturales (Ramírez *et al.*, 2007). Muchos de ellos son manantiales termales, localizados en grandes y profundas fracturas, que permiten que el agua alcance altas temperaturas. Las comunidades microbianas poco exploradas de los manantiales termales gallegos son un recurso potencial de nuevas enzimas termoestables. Se ha estudiado la presencia de compuestos orgánicos solubles (González-Barreiro *et al.*, 2009) y se han aislado varios microorganismos productores de enzimas lipolíticas (Deive *et al.*, 2013), pero su potencial nunca ha sido estudiado desde un enfoque metagenómico.

2. Materiales y métodos

2.1 Material biológico

2.1.1 Recogida y procesamiento de muestras ambientales de aguas y lodos termales

Se tomaron muestras de agua del manantial de Río Caldo (Ourense, Galicia, España) (GPS 41.86113, -8.1062), encima del cual se ha construido el Balneario Lobios Caldaria. Este balneario cuenta con un grifo conectado a una bomba que toma el agua directamente del manantial, a partir del cual se recogió la muestra de agua termal. Se empleó un bidón de 25 L, lavado con etanol y aclarado con agua termal del propio manantial. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente hasta que se filtró (en el mismo día o posteriores) con un filtro de nitrocelulosa de 0.22 µm de tamaño de poro empleando un dispositivo de filtración con soporte reutilizable para filtros (Nalgene). El filtro se almacenó a 4°C.

También se tomaron muestras de sedimentos del mismo manantial. Este balneario cuenta con un acceso cubierto a un pozo de unos 3 m de profundidad con sedimentos en el fondo, donde se vierten las aguas termales antes de llegar a una piscina artificial pública. Se recogieron muestras de dichos sedimentos en frascos estériles y se guardaron a temperatura ambiente hasta llegar al laboratorio, donde se almacenaron a 4°C.

2.1.2 Cepas de bacterias y levaduras

En la Tabla 20 se recogen los detalles de las cepas bacterianas y de levaduras que han sido empleadas para llevar a cabo el trabajo de este capítulo, junto con su genotipo y la finalidad con la que se han utilizado.

Tabla 20: Características de las cepas microbianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Aplicación	Procedencia
CEPAS DE BACTERIAS			
<i>E. coli</i> ECOSTM Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsaR17 supE44 reiA1 lac [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (TetR)]</i>	Mantenimiento y propagación de plásmidos recombinantes	Yeastern
<i>E. coli</i> EPI300TM-T1R	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) (StrR) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG trfA tonA dhfr</i>	Construcción de metagenoteca	Epicentre
CEPAS DE LEVADURAS			
<i>S. cerevisiae</i> BJ3505	<i>pep4::HIS3 prb-Δ1.6R HIS3 lys2-208 trp1- Δ101 ura3-52 gal2 can1</i>	Hospedador de expresión	Eastman Kodak Company

2.1.3 Vectores

En la Tabla 21 se recogen los distintos vectores que se han empleado para la realización del trabajo de este capítulo, junto con sus características y la finalidad de cada uno.

Tabla 21: Vectores empleados en este trabajo.

Vector	Tipo	Uso	Marcadores	Procedencia
pCC1FOS	Fósmido	Construcción de la metagenoteca	Chl ^R	Epicentre
pUC19	Plásmido episomal multicopia	Subclonación para identificación de secuencias codificantes de actividad lipolítica	amp ^r	Novagen
YEpFLAG-1	Plásmido episomal multicopia	Clonación y expresión de nuevas enzimas lipolíticas en <i>S. cerevisiae</i>	TRP y amp ^r	Eastman Kodak Company

2.1.4 Oligonucleótidos

En la Tabla 22 se recogen los oligonucleótidos que han sido empleados en este trabajo, especificando la aplicación y los detalles de sus secuencias.

Tabla 22: Oligonucleótidos empleados en este trabajo para clonación y secuenciación.

Gen	Tipo y secuencia de cada cebador	Finalidad
T7	5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'	Secuenciación del extremo 5' de los insertos clonados en pCC1FOS.
pCC1FOS Rev	5' - CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC - 3'	Secuenciación del extremo 3' de los insertos clonados en pCC1FOS.
M13F	5' - TGTAACACGACGGCCAGT - 3'	Secuenciación de los extremos de insertos en pUC19
M13Rev	5' - CAGGAAACAGCTATGACC - 3'	
FOS155CE-1	5' - CGATGCCAAACGCTTCTTCC - 3'	Secuenciación interna del fragmento subclonado de FOS 155
FOS4A-1	5' - GGACGATACGGTCTTTGATA - 3'	Secuenciación por "primer walking" del fragmento subclonado de FOS 4
FOS4A-2	5' - GAAGCGGCTACACGAACAA - 3'	
FOS4A-3	5' - CAGCGAAGGCGGTCAAG - 3'	
FOS4A-4	5' - GCTGGCAGATGGCGTATG - 3'	
FOS4A-5	5' - AGCACGGTGTCTCTTGG - 3'	
FOS4A-6	5' - CTACCAGGAAGACGGAAC - 3'	
FOS4A-7	5' - CTGTCCCATTCGTATCCC - 3'	
FOS4A-8	5' - CAGTTCTGTCGCGCACTCC - 3'	
FOS4A-9	5' - CGCTGGCGAAGATGTACG - 3'	
YFF4A3F*	5' - <u>AGAGACTACAAGGATGACG</u> <u>ATGACAAGAGCCGCCCGGTACCG</u> - 3'	Clonación de la ORF 3 del fósmido FOS 4 en YEpFLAG-1.
YFF4A3R*	5' - <u>GACGCTCGACGGATCAGCGGCC</u> <u>GCTTAGGCGCAGCCGAGTTCCTCGC</u> - 3'	
EST50F	5' - GCGGGGAAATGAATGAAGGC - 3'	Amplificación del gen Est50
EST50R	5' - TGAAACACAACGGCAGCTC - 3'	

* la secuencia subrayada se corresponde con la secuencia complementaria a la región adyacente al sitio de clonación múltiple del vector YEpFLAG1.

2.2 Métodos microbiológicos

2.2.1 Mantenimiento de las cepas

El mantenimiento a corto y largo plazo, tanto de las cepas bacterianas como de levaduras, se llevó a cabo tal y como se explicó en el apartado 2.2.1 del capítulo 1.

2.2.2 Medios de cultivo

A continuación se describe la composición y preparación de los medios de cultivo empleados para cultivar bacterias y levaduras que no han sido previamente descritos en el apartado 2.2.2 del capítulo 1. Los medios de cultivo líquidos se prepararon disolviendo los componentes en agua destilada. Para los medios sólidos en placas *Petri* se agregó adicionalmente agar bacteriológico a una concentración del 1.5 % como agente solidificante. La esterilización se realizó en un autoclave durante 20 minutos a 121°C y 2 Ba de presión.

El medio de cultivo para el enriquecimiento de organismos productores de enzimas lipolíticas presentaba aceite de oliva como única fuente de carbono. Su composición fue la siguiente: 2 % aceite de oliva, 0.2 % NaCl, 0.04 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.07 % $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.05% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.03 % KH_2PO_4 ; 0.03 % K_2HPO_4 ; 0.05 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a lo que se añadió 0.01% de una solución de elementos traza que contenía 0.026 % H_3BO_3 , 0.05 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.05 % MnSO_4 , 0.006 % Na_2MoO_4 y 0.07 % ZnSO_4 (Rahman *et al.*, 2007). Se preparó el medio de cultivo disolviendo todos sus componentes excepto el aceite de oliva, que se añadió en último lugar a una concentración final del 1 %, se emulsionó con una batidora durante 2 min a velocidad máxima y se autoclavó.

2.2.3 Condiciones de cultivo en medio líquido.

Cultivo de enriquecimiento: Se realizó un cultivo de enriquecimiento en un medio que tenía aceite de oliva como única fuente de carbono, para favorecer el crecimiento de aquellos microorganismos que producen enzimas lipolíticas. 500 mL de medio de cultivo se inocularon con 5 g de lodos (peso húmedo) procedentes del manantial termal y se incubaron 24 horas en un baño a 65°C con agitación de 30 r.p.m. Pasado este tiempo se inoculó medio fresco con 5 mL de cultivo y se dejó crecer otras 24 horas.

Cultivos de los clones obtenidos en las metagenotecas para búsqueda funcional de enzimas lipolíticas y almacenamiento: Los clones se sembraron con puntas de pipeta de 5 en 5 en pocillos de placas de 96 pocillos, a excepción de los 60 primeros que se sembraron individualmente. Los pocillos, de 1.2 mL de volumen total, contenían 200 μL de LB suplementado con 12.5 mg/mL de cloranfenicol. Los cultivos se dejaron crecer 24 horas a 37°C bajo agitación orbital continua a 200 r.p.m. Se inclinaron las placas para una mejor aireación. Pasado este tiempo, se tomaron 5 μL de cada pocillo que se emplearon

para la detección funcional de la actividad lipolítica mientras que al resto del cultivo se le añadió glicerol hasta una concentración final del 20 % y se guardó a -80°C.

Cultivos de clones de las metagenotecas para PCR de colonias: Se cultivaron los clones en placas de 96 pocillos, cada uno de 1.2 mL de capacidad, con 200 µL de medio LB-cloranfenicol con arabinosa al 0.02 % como inductor multicopia de los fósidos, (se añade a partir de un stock de arabinosa al 10 % esterilizado por filtración). Los pocillos se inocularon con una pequeña cantidad de cultivo congelado a -80°C de cada clon positivo. Los cultivos se incubaron durante 18 horas a 37°C bajo agitación orbital continua de 250 r.p.m.

Cultivos en tubo o matraz para expresión de proteínas recombinantes: se realizaron como se ha explicado en el apartado 2.2.3 del capítulo 1.

2.2.4 Tinción y observación de células bacterianas al microscopio

Para la observación de bacterias con el microscopio óptico se tiñeron con azul de metileno. Se trata de un método de tinción simple (no específico) con un cromóforo básico. El citoplasma de las células bacterianas tiene una ligera carga negativa cuando crecen en medios con pH neutro (o cerca de este punto) y por tanto se verá favorecida la unión de tintes básicos.

Con el asa de siembra se extendió una delgada película de cultivo sobre un portaobjetos y se dejó secar al aire completamente. Se pasó el portaobjetos 3 o 4 veces por la llama para fijar las células por calor, se cubrió con una solución de azul de metileno 0.1 % y se dejó teñir la muestra durante 2 min. Se lavó con agua destilada el exceso de colorante, se dejó secar y se observó la muestra con el microscopio óptico.

2.3 Técnicas de manipulación de ADN

Los métodos empleados para la extracción de plásmidos y fósidos ya han sido descritos dentro del apartado 2.3 del capítulo 1, de modo que aquí únicamente se describe la extracción del ADN metagenómico a partir de las aguas termales y de los cultivos de enriquecimiento, la construcción de las metagenotecas y la amplificación por PCR así como la subclonación de los clones positivos en plásmidos.

2.3.1 Extracción de DNA metagenómico de aguas termales y de cultivo de enriquecimiento

Para la extracción y purificación del ADN metagenómico de ambas muestras (aguas termales y cultivo de enriquecimiento) se empleó el kit comercial *Metagenomic DNA Isolation Kit for Water* (Epicenter) siguiendo las instrucciones del proveedor. Este kit está diseñado para extraer ADN metagenómico de alto peso molecular, por lo que la

rotura de las células es enzimática, empleando lisozima y Proteinasa K. El ADN obtenido mostró el tamaño adecuado para su uso en la construcción de metagenotecas en fósidos, evitando el paso intermedio de selección por tamaño.

Para la extracción de ADN metagenómico de aguas se partió de un filtro de nitrocelulosa con el que se filtraron 25 L de agua termal, según el apartado de recogida de muestras. Se cortó el filtro en 4 trozos y se dispusieron a lo largo de la pared interior de un tubo *Falcon* de 50 mL, con la cara donde se encuentran atrapadas las células hacia el interior del tubo. Las células se resuspendieron por agitación con un vórtex en 1 mL de tampón de lavado (suministrado por el kit) con 0.2% Tween 20. Se pasó la suspensión a un tubo *Eppendorf* y las células se recogieron por centrifugación a 14000 rpm durante 2 min.

En el caso del cultivo de enriquecimiento se partió de 7.5 mL de cultivo. Se recogieron las células por centrifugación y se procedió a la extracción de ADN de las mismas.

Una vez aisladas las células, se procedió a extraer el ADN metagenómico, siguiendo el protocolo recomendado por el distribuidor del kit. En primer lugar se rompieron las células y se eliminó el RNA de la muestra. Para ello se resuspendieron las células en 300 μ L de tampón TE, se añadieron 2 μ L de la solución de lisozima y 1 μ L de RNasa A, se mezcló y se incubó el tubo 30 min a 37°C. A continuación se añadieron 300 μ L de Solución de Meta-Lisis y 1 μ L de Proteinasa K, se mezcló y se incubó a 65°C durante 15 min. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se incubó en hielo 5 min. En segundo lugar se purificó el ADN mediante distintos pasos de precipitación selectiva. Se añadieron 350 μ L de Reactivo de Precipitación de Proteínas y se mezcló con el vórtex vigorosamente durante 10 min. Tras una centrifugación de 10 min a 14000xg a 4°C se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadieron 570 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión varias veces y se precipitó el ADN por centrifugación durante 10 min a 14000xg a 4°C. Con una pipeta se eliminó el exceso de isopropanol sin perturbar el pellet, se centrifugó de nuevo brevemente la muestra y se eliminó cualquier líquido residual con la pipeta. Se repitió el lavado, pero esta vez con 500 μ L de etanol al 70%. Tras eliminar cualquier líquido residual se dejó secar el ADN precipitado a temperatura ambiente durante 8 minutos, y se resuspendió en 50 μ L de tampón TE.

2.3.2 Construcción de la metagenoteca de aguas termales.

Para la construcción de la metagenoteca se empleó el fósido pCC1FOS, del *CopyControl™ Fosmid Library Production Kit* (Epicentre) y el ADN metagenómico. Se siguieron las instrucciones y recomendaciones del fabricante (protocolo explicado detalladamente en el apartado 2.5 del capítulo 1).

Para la metagenoteca de aguas termales se partió de 6 μ L de la extracción de ADN metagenómico de aguas (aproximadamente 84 ng) para la reacción de reparación de extremos, y se siguió el protocolo indicado por el kit. Al ser una pequeña cantidad de

ADN, en el último paso del proceso de empaquetamiento en el cual se diluye la suspensión de fagos se alcanzó un volumen final de 300 μL , en lugar de 1 mL. Tras realizar un ensayo de titulación se infectaron las células *E. coli* EPI300™-T1R con una dilución 1:4 de la metagenoteca en fagos, y se sembraron un total de 45 placas de medio selectivo LBC para obtener un número aproximado de 11000 clones. Se empleó un tubo sin fagos como control de contaminación.

Para la metagenoteca de cultivos enriquecidos se partió de 6.5 μL de la extracción de ADN a partir del cultivo enriquecido (aproximadamente unos 1.22 μg). Tras realizar un ensayo de titulación de la metagenoteca en fagos se infectaron las células de *E. coli* EPI300™-T1R con la metagenoteca en fagos sin diluir, y se sembraron un total de 40 placas de medio selectivo para obtener un número aproximado de 6000 clones. Se empleó un tubo control sin fagos como control de contaminación.

2.3.4 Amplificación por PCR

En este trabajo se identificó un nuevo gen, denominado *LOB4Est*, que codifica para una esterasa. Se amplificó a partir del ADN fosmídico extraído del clon positivo de la librería con los cebadores indicados en la Tabla 23. Se empleó para ello una ADN polimerasa de alta fidelidad, la Pfu ADN polimerasa (Thermo Scientific). La mezcla de reacción (50 μL) estaba compuesta por los siguientes componentes: 1 μL DNA plasmídico del clon positivo FOS4A subclonado en pUC19, 2 μL Pfu polimerasa (Fermentas), 5 μL tampón, 4 μL mezcla de dNTPs (2.5 mM cada uno), 3 μL de cada cebador (20 μM) YFF4A3F y YFF4A3R, 24 μL DMSO y agua bidestilada hasta completar los 50 μL . La PCR se desarrolló siguiendo el siguiente programa térmico: desnaturalización inicial (95°C, 5 min); seguido de 30 ciclos de desnaturalización (95°C, 30 seg), anillamiento (64°C, 30 seg) y extensión (72°C, 1 min 10 seg); y un paso final de 72°C durante 7 min.

2.3.5 PCR de colonias formato 96-pocillos.

Se realizaron PCRs de colonias de comprobación para detectar la presencia del gen Est50 de *Geobacillus stearothermophilus*, que codifica para una carboxilesterasa termófila, en la genoteca del cultivo de enriquecimiento. Los cebadores se diseñaron a partir de la secuencia del gen con la herramienta online “Thermo : REviewer™ - sequence analysis tools”. La longitud del producto de PCR resultante es de 1213 pb.

Se realizaron cultivos en placas de 96 pocillos de los clones positivos de la metagenoteca del cultivo enriquecido. Una vez terminado el cultivo se transfirieron a tubos pequeños de 200 μL , se centrifugaron 5 min a 3000 r.p.m. y se resuspendieron las células en 75 μL de agua. Las células se lisaron 30 seg en el microondas y se centrifugaron de nuevo para eliminar el precipitado de células. Se emplearon 5 μL del sobrenadante para realizar las PCRs, de 20 μL cada una. La mezcla de reacción contenía (para 100 μL): 4 μL Dream Taq, 10 μL tampón 10X, 6 μL cebador Est50F (20 μM), 6 μL cebador Est50R (20 μM), 8 μL de

mezcla de dNTPs (2.5 mM cada uno), 4 µL de DMSO y agua hasta completar 100 µL. El programa térmico empleado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 3 min, 95°C; 30 ciclos de desnaturalización (95°C, 3 min), anillamiento (62°C, 30 seg) y extensión (72°C, 1 min); y una etapa de extensión final de 72°C durante 7 min.

2.3.6 Digestión con endonucleasas de restricción

Las digestiones del ADN con endonucleasas de restricción (de las casas comerciales: *Roche*, *Takara* y *Fermentas*) se realizaron según el apartado 2.3.3 del capítulo 1. Al finalizar la digestión las enzimas fueron inactivadas por calor según las recomendaciones del proveedor, y se emplearon para realizar los ligamientos sin purificar previamente.

2.3.7 Desfosforilación

El plásmido pUC19 fue desfosforilado después de la digestión. Esta reacción consiste en eliminar los grupos fosfato en los extremos digeridos del vector para reducir el fenómeno de autoligamiento y evitar la obtención de clones con el plásmido vacío tras la transformación de bacterias. Para ello se empleó una fosfatasa alcalina, SAP (Roche). La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente: 50 ng de vector digerido, 1 µL de tampón de reacción 10X, 1 µL SAP, y H₂O bidestilada estéril hasta completar los 10 µL. La mezcla de reacción se incubó 15 minutos a 37°C y la enzima se inactivó a continuación incubando 15 min a 65°C.

2.3.8 Ligamiento

Para el ligamiento de fragmentos digeridos del fósido del clon positivo FOS4A con el plásmido PUC19 digerido con enzimas de restricción, se empleó la enzima T4 ligasa (Thermo Scientific). La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente: 50 -75 ng de ADN plasmídico digerido y desfosforilado, 150-250 ng de ADN de inserto, 2 µL de tampón de reacción, 1 µL de T4 ligasa y H₂O bidestilada estéril hasta completar los 20 µL totales. La mezcla de reacción se incubó toda la noche a 16°C, 1 h a 22°C por la mañana al día siguiente, y 15 min a 65°C para inactivar la enzima. Se emplearon 10 µL de esta reacción para transformar 50 µL de células competentes (como ya se ha descrito en el apartado 2.4.3 del capítulo 1).

2.4 Detección funcional de actividad lipolítica en las metagenotecas

Para la detección de actividad lipolítica se emplearon gotas de 5 µL de los cultivos realizados en placas de 96 pocillos, con los clones agrupados de 5 en 5 (Fig. 43A), que se sembraron en placa de LB con tributirina emulsionada y suplementadas con cloranfenicol (Glogauer *et al.*, 2011). Para cada placa de 96 pocillos se sembraron dos placas Petri de medio LBC con tributirina. Como control negativo se emplearon cultivos

de la cepa *E. coli* EPI300 TM-T1R (Epicenter) que presentan el fósforo pCC1FOS con el DNA control proporcionado con el kit como inserto (Fig. 43B).

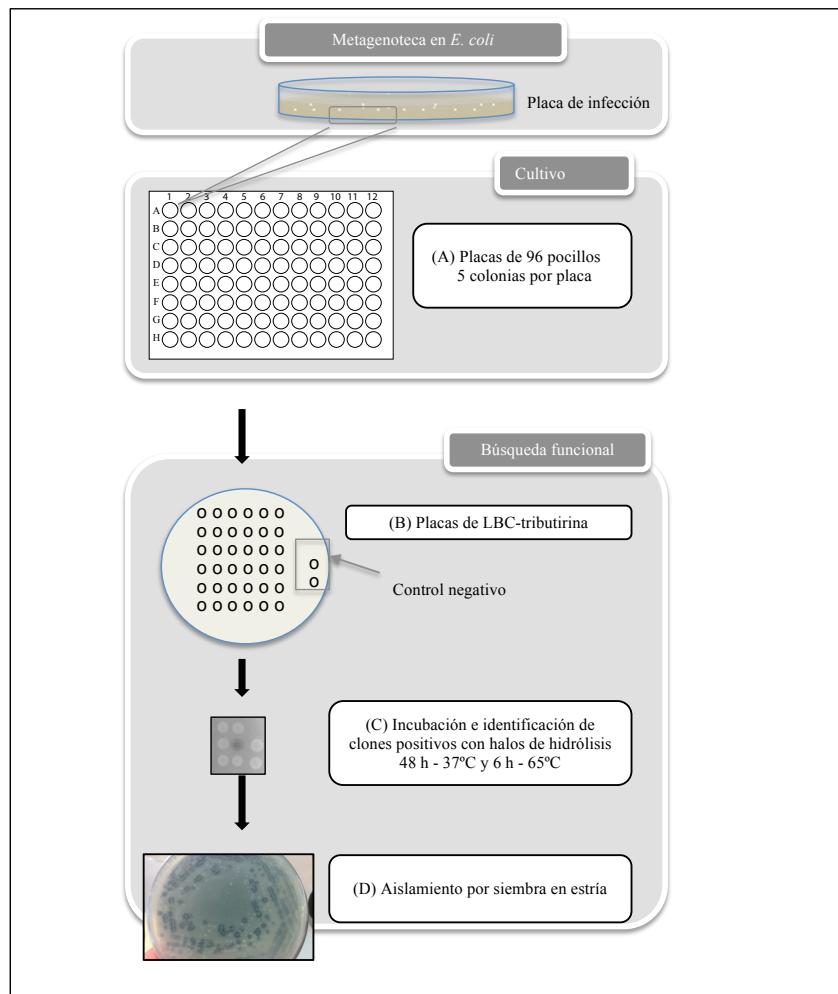


Figura 43: Esquema del flujo de trabajo para realizar la búsqueda de clones con actividad lipolítica en la metagenoteca de aguas termales en *E. coli*. (A) Cultivo, (B) siembra en placas con medio específico para detectar actividad, (C) incubación y detección de clones positivos, (D) aislamiento de clones positivos.

Las células se dejaron crecer durante 2 días a 37°C. Después se pasaron a 65°C donde se mantuvieron al menos 6 h para detectar enzimas lipolíticas termófilas que sólo fueran

activas a altas temperaturas. Los transformantes con halos claros se seleccionaron como posibles clones productores de lipasas/esterasas (Fig. 43C).

Como cada gota se correspondía a una mezcla de 5 clones distintos, los clones positivos se aislaron en placa por siembra en estría por agotamiento a partir de los cultivos almacenados a -80°C (Fig. 43D). Se emplearon placas de LB tributirina con cloranfenicol para detectar colonias productoras de enzimas lipolíticas mediante la aparición de halos de hidrólisis.

2.5 Identificación de las secuencias responsables de la actividad lipolítica y análisis con herramientas bioinformáticas

El fósido del clon positivo seleccionado, FOS4, se purificó empleando FosmidMAX DNA purification kit (Epicentre Biotechnologies) y se sometió a digestión con endonucleasas de restricción que también tuvieran dianas en el sitio de clonación múltiple del plásmido pUC19. Los fragmentos obtenidos se subclonaron en dicho plásmido, digerido y desfosforilado, mediante ligamiento y se transformaron células competentes ECOS Blue con los plásmidos recombinantes. Las células transformadas se sembraron en medio de cultivo LBA-tributirina para seleccionar aquellos clones cuyos plásmidos contenían la secuencia responsable de la actividad lipolítica. El inserto de la colonia positiva detectada fue secuenciado por la técnica de “primer walking” empleando los oligonucleótidos mostrados en la tabla 23, en el servicio de secuenciación de Sistemas Genómicos (Valencia, España).

Las pautas de lectura abiertas (ORFs- *Open reading frames*) se detectaron con la herramienta online MetaGeneMark (Besemer & Borodovsky, 1999; Zhu *et al.* 2010) y las búsquedas de similitud de secuencia se llevaron a cabo con BLASTP (Altschul, 1990). La ORF que codificaba una proteína con similitud con enzimas lipolíticas, ORF3, fue seleccionada para continuar con el estudio. El alineamiento múltiple de las secuencias de la ORF3 y otras esterasas de la familia VIII seleccionadas se realizó con el programa ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). La búsqueda de señales de secreción se llevó a cabo con el programa SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011). Los parámetros físico-químicos de las proteínas fueron predichos por la herramienta *online* ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005).

2.6 Construcción de los plásmidos recombinantes

Una vez identificada la nueva enzima lipolítica LOB4Est se diseñaron cebadores para la amplificación de su gen (Tabla 22), para su posterior clonación y expresión. Se realizó siguiendo el mismo procedimiento que con las enzimas de *T. thermophilus* en el capítulo 1 con el plásmido YEpFLAG-1 y la levadura *S. cerevisiae* BJ3505 (apartado 2.4 del capítulo 1).

2.7 Métodos de extracción de proteínas

2.7.1 Fraccionamiento celular

La localización subcelular de la enzima recombinante se estudió por fraccionamiento celular, siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 2.8.2 del capítulo 1.

2.8 Determinación de actividad enzimática

Para comprobar la expresión de las proteínas recombinantes en BJ se realizaron cultivos de 2 mL con medio YPHSM inoculados con una pequeña cantidad de células de un cultivo fresco en placa a las 72 h de incubación. Se procedió a determinar la actividad lipolítica tanto del sobrenadante como del extracto crudo de las células. La caracterización bioquímica también se realizó empleando el medio extracelular de dichos cultivos.

2.8.1 Medida de actividad lipolítica

La actividad lipolítica se determinó usando un método espectrofotométrico empleando p-nitrofenil laurato como sustrato, siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 2.6.5 del capítulo 1. En este caso las condiciones de reacción fueron: 150 mM pH 7.5 Tris/HCl 40 mM CaCl₂ como tampón de reacción y una temperatura de 40°C.

2.8.2 Caracterización bioquímica de la enzima recombinante

La preferencia de sustrato se determinó empleando como sustratos p-nitrofenil ésteres de cadenas laterales de diferente longitud: p-nitrofenil butirato (C4), p-nitrofenil hexanoato (C6), p-nitrofenil octanoato (C8) y p-nitrofenil laurato (C12). Los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) se determinaron midiendo las tasas de conversión iniciales empleando p-nitrofenil laurato como sustrato a diferentes concentraciones (0.002-2.5 mM).

La dependencia de la actividad lipolítica con la temperatura se estudió a diferentes temperaturas entre 40 y 80°C, a un pH de 7.5. El pH del tampón se ajustó a cada temperatura. La dependencia de la actividad lipolítica con respecto al pH se estudió a 40°C empleando diferentes tampones a pH de entre 4.5 y 8.5: tampón acetato sódico/ácido acético (4.5, 5, 5.5); tampón Tris/ácido maleico (6, 6.5, 7, 7.5) y tampón Tris/HCl (7.5, 8, 8.5). En ambos casos, el tiempo de reacción fue de 10 min, para minimizar los posibles efectos de los valores extremos de pH y temperatura en la estabilidad de la proteína.

La termoestabilidad se estudió midiendo la actividad residual después de incubar las muestras de medio extracelular conteniendo la enzima recombinante a 50 y 60°C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación.

2.8.3 Medida de actividad β -lactamasa

La actividad β -lactamasa se determinó por un método espectrofotométrico empleando nitrocefín como sustrato (3-(2,4-dinitrostyryl)-(6R,7R-7-(2-thienylacetamido)-ceph-3-em-4-carboxylic acid, E-isomer) (Calbiochem) (Jeon *et al.*, 2011). Se incubaron 150 μ L de tampón de reacción (0.1 M fosfato sódico, 1 mM EDTA, pH 7.0) con 10 μ L de muestra proteica (medio extracelular) a 40°C durante 5 min. La reacción se inició con la adición de 40 μ L de una solución de nitrocefín de 5 mM, para alcanzar una concentración final de 1 mM. Se midió la variación de absorbancia a 486 nm durante 30 min. Se preparó un blanco empleando agua en lugar de muestra proteica, y un control empleando medio extracelular de un cultivo de la cepa de *S. cerevisiae* BJ3505 transformada con el vector YEpFLAG-1 vacío. La actividad se expresó en valores relativos con respecto al control.

2.9 Métodos electroforéticos

Para la electroforesis de ADN en geles de agarosa y para la electroforesis y tinción/detección de proteínas en geles SDS-PAGE se siguieron los procedimientos indicados en el apartado 2.9 del capítulo 1.

2.10 Métodos cromatográficos

Para la purificación de la proteína por cromatografía de inmunoafinidad se siguieron los procedimientos indicados en el apartado 2.11 del capítulo 1.

3. Resultados y discusión

Del gran número de manantiales termales de Galicia, se escogió el de Río Caldo para este estudio debido a su alta temperatura (76°C) y su pH alcalino 8.2. De este modo las enzimas lipolíticas aisladas a partir de este ambiente podrían ser también termoalcalófilas, una característica especialmente interesante para su uso industrial. Está situado en el municipio de Lobios, a 70 km de Ourense (GPS 41.86113, -8.1062) y presenta agua bicarbonatada-fluorurada-clorurada sódica (Ramírez *et al.*, 2007). Se tomaron muestras de sedimentos y agua del manantial, a partir de las cuales se construyeron dos metagenotecas con el fósido pCC1FOS en *E. coli*, que se sometieron a una búsqueda funcional de enzimas lipolíticas.

3.1 Construcción de metagenoteca de un cultivo de enriquecimiento y búsqueda funcional de actividad lipolítica

La extracción de ADN metagenómico a partir de sedimentos procedentes del manantial de aguas termales de Río Caldo (Ourense, España), en cantidad y calidad suficiente para su utilización en la construcción de una librería metagenómica en fósidos no fue posible. Los rendimientos proporcionados por el kit comercial no eran reproducibles y el ADN obtenido era de baja pureza y concentración. Al emplear otros métodos alternativos de extracción (Zhou *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 2010) nos encontramos con un ADN metagenómico sucio, que se perdía en posteriores pasos de purificación (extracción de banda en gel, G-CAPSULE). Este obstáculo, junto con el hecho de que la frecuencia de clones positivos detectados en una búsqueda por medio de metagenómica funcional suele ser bastante baja, dirigió nuestros esfuerzos a la realización de un cultivo de enriquecimiento a partir de dichos sedimentos.

Se inoculó un medio de cultivo cuya formulación tenía aceite de oliva como única fuente de carbono con sedimentos procedentes del manantial termal. Esto ejerció una presión selectiva sobre los organismos presentes en la muestra, favoreciendo el crecimiento de aquellos que expresaban enzimas lipolíticas. Una vez finalizado el cultivo se analizaron muestras de los microorganismos presentes mediante la observación de células teñidas con azul de metileno en el microscopio óptico. Se observaron bacilos, cadenas de bacilos y esporas en formación (Fig. 44A).

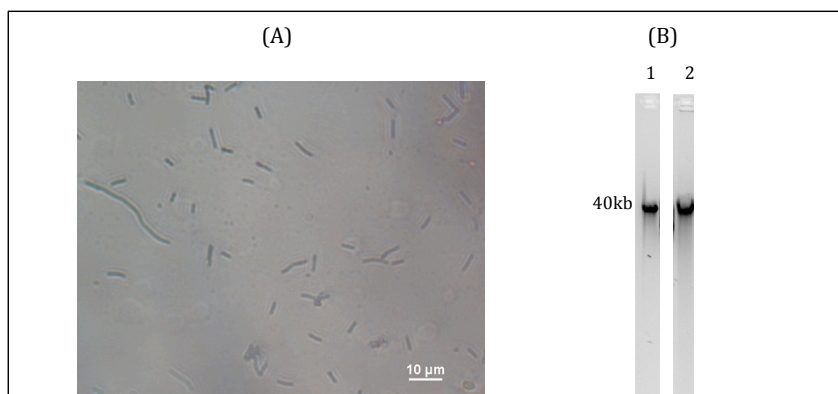


Figura 44: (A) Imagen en el microscopio óptico de los microorganismos presentes en el cultivo de enriquecimiento. Tinción con Azul de Metileno (B) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Tinción con GelGreen. Carriles: 1: ADN control 40kb (Epicentre); 2: ADN metagenómico.

Se tomaron 7.5 mL de cultivo y se realizó la extracción del ADN metagenómico con el kit Metagenomic DNA Isolation Kit for Water (Epicenter). Se obtuvo un ADN con una concentración de 189 ng/μL, y un tamaño aproximado de 40 kb (Fig. 44B), por lo que

resultaba adecuado para construir una metagenoteca con el kit del fósido pCC1FOS (Epicenter) directamente, sin ser necesario ningún paso adicional de selección por tamaño. Se partió de 6.5 μL de la extracción de ADN metagenómico (aproximadamente 1.22 μg) y se llevó a cabo la reparación de extremos para generar extremos romos, se ligó con el fósido preparado del kit y se llevó a cabo el empaquetamiento de la metagenoteca en fagos.

Una vez obtenida la metagenoteca en fagos, se procedió a la titulación de la misma, o lo que es lo mismo, la infección de 100 μL de células de *E. coli* EPI300 con 10 μL de distintas diluciones de la genoteca. Esto permite determinar la dilución adecuada a emplear para transferir la genoteca a *E. coli*, con el fin de obtener colonias aisladas para su posterior manipulación, y para calcular el rendimiento de la genoteca. El objetivo era obtener un número de 100-200 colonias por placa. El recuento de unidades formadoras de colonia (ufc) por placa (Tabla 24) indicó que no era necesario diluir la metagenoteca en fagos para transferirla a *E. coli*. La librería obtenida tenía un rendimiento de 1.68×10^4 ufc/mL, lo que suponía, para los 500 μL de volumen total del empaquetamiento, una metagenoteca de un tamaño estimado de 8400 clones.

Tabla 23: Titulación de la metagenoteca de cultivos enriquecidos

Dilución	Recuento de colonias
0	168
1:10	16
1:100	3
1:1000	0

Se escaló la reacción de infección de *E. coli* para obtener el equivalente a 40 reacciones estándar, que se sembraron en 40 placas *Petri* con medio LBC y se obtuvo una metagenoteca en *E. coli* de 9210 clones. Estos clones se recogieron de 5 en 5 con una punta de pipeta estéril y se sembraron en placas de 96 pocillos y se realizó una búsqueda funcional de los mismos en placas *Petri* con LBC-tributirina. Se obtuvieron un total de 167 clones positivos con halos de hidrólisis de distintos diámetros (Fig. 45).

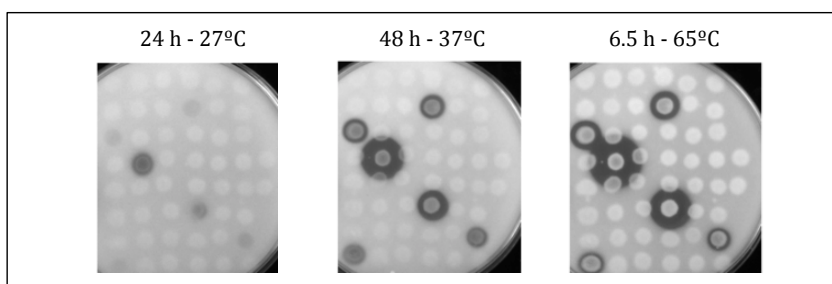


Figura 45: Ejemplo de una de las placas de detección de actividad lipolítica, donde se muestran los clones positivos del 43 al 48, con halos de distinto diámetro a distintos tiempos de incubación

3.2 Selección, subclonación y análisis de clones positivos de la metagenoteca enriquecida

Se seleccionaron dos clones que fueron aislados en placa, y cuyos fósmidos fueron digeridos con enzimas de restricción y subclonados en el plásmido pUC19: FOS 15, uno de los que presentaban halos de hidrólisis de tamaño medio, y FOS 155, que presentaba halos de gran tamaño (Fig. 46A). Los fragmentos subclonados con actividad, en el sitio de restricción de *Sph*I, eran de aproximadamente 4200 pb para el fragmento de FOS15 y de 1900 pb para el FOS155 (Fig. 46B).

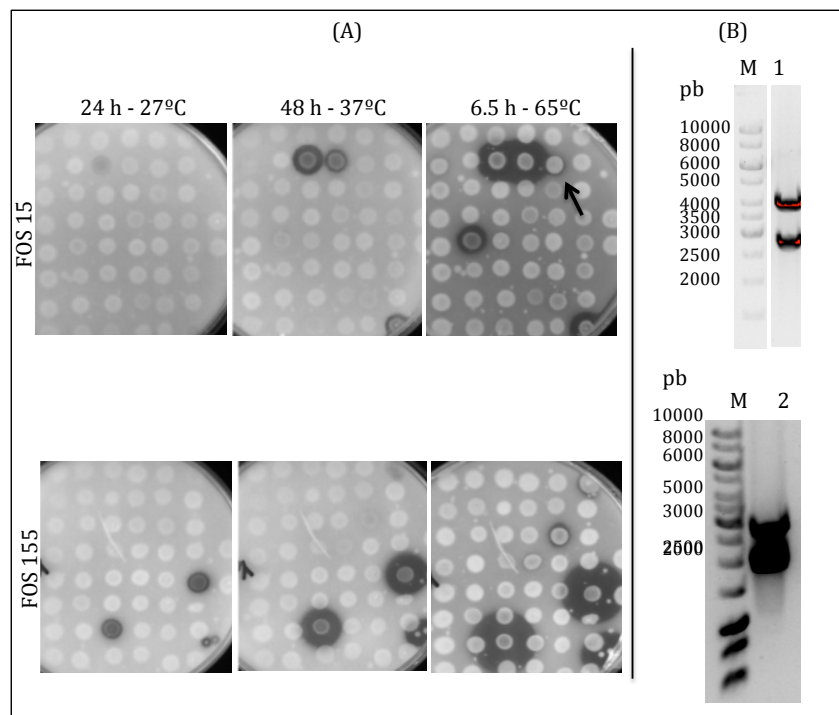


Figura 46: (A) Placas del ensayo de búsqueda de actividad lipolítica en placa con tributirina que contienen los clones FOS 15 y FOS 155. (B) Electroforesis del resultado de la digestión de los plásmidos recombinantes que contienen los fragmentos subclonados procedentes de los clones. Carriles: M: marcador de pesos moleculares. 1: Digestión del plásmido subclonado de FOS 15 con *Sph* I. 2: Digestión del plásmido subclonado de FOS 155 con *Sph* I. Tinción con GelGreen.

El fragmento subclonado de FOS 15 fue secuenciado en ambos extremos por los cebadores M13F y M13Rev (Tabla 22). Las secuencias obtenidas, analizadas por BLASTn, mostraron una alta similitud (97% y 89% de similitud con cada cebador) con

los genomas de *Geobacillus* sp. Y412MC52 (número de acceso: CP002442.1) y *Geobacillus* sp. Y412MC61 (número de acceso: CP001794.1). Al analizar el genoma de *Geobacillus* sp. Y412MC52 las regiones de similitud se correspondían con los loci GYMC52_3161 y GYMC52_3156, entre los que se encuentra un gen que codifica para una enzima carboxilesterasa de tipo B (número de acceso: ADU95516.1), de 498 aa.

El fragmento subclonado procedente del clon FOS 155 se secuenció completamente con los cebadores M13F, M13R y 155.1 (Tabla 22) y empleando el programa MetaGeneMark se identificó una ORF que codificaba para una carboxilesterasa de 247 aa. El análisis BLASTp de dicha proteína reveló una alta similitud de secuencia aminoacídica (99-98%) con 8 esterases ya publicadas y caracterizadas del género *Geobacillus* (Tabla 24). Estas enzimas tienen unas características fisicoquímicas similares pero con ligeras diferencias a pesar de su alta similitud: actividad óptima a altas temperaturas (la mayoría entre 60 y 70°C) y pH alcalino (entre pH 7.5 y 10) con preferencia por sustratos con cadenas laterales cortas, aunque presentando distintos patrones en cuanto a la preferencia de sustrato.

Tabla 24: Similitud de secuencia aminoacídica de la enzima responsable de la actividad lipolítica en el clon FOS155 y carboxilesterasas del género *Geobacillus* ya caracterizadas.

Enzima(número de acceso)	Identidad	Cobertura de secuencia	Referencia
Est1 de <i>Geobacillus</i> sp. (CBI14852.1)	99 %	99%	(Tekedar & Sanli-Mohamed, 2011)
Est2 de <i>Geobacillus</i> sp. (CBI14853.1)	98 %	99%	(Tekedar & Sanli-Mohamed, 2011)
Est30 de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> (AAN81911.1)	98 %	99 %	(Ewis <i>et al.</i> , 2004)
Est A de <i>Geobacillus thermoleovorans</i> YN (ABB90597.1)	98 %	99 %	(Soliman <i>et al.</i> , 2007)
BestE de <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Q06174.2)	98 %	99 %	(Henke & Bornscheuer, 2003)
Est30 <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426 (WP_011232515.1)	98 %	99 %	(Montoro-García <i>et al.</i> , 2009)
Est <i>Geobacillus</i> sp. ZH1 (AEI59125.1)	98 %	99 %	(Zhu <i>et al.</i> , 2012)
Est3 de <i>Geobacillus</i> sp. (CBI14854.1)	98 %	99 %	(Tekedar & Sanli-Mohamed, 2011)

3.3 Evaluación de la representación del género *Geobacillus* entre los positivos de la metagenoteca

El género *Geobacillus* es una reconocida fuente de microorganismos productores de enzimas lipolíticas termófilas, que han sido objeto de estudio en numerosas ocasiones. Las enzimas lipolíticas descritas en *Geobacillus* se podrían integrar en varios grupos:

- El primero de ellos estaría compuesto por 11 esterasas de 243-249 aminoácidos y un peso molecular en torno a 30 kDa. 8 de ellas comparten una gran similitud de secuencia, y pertenecen a una nueva familia de enzimas lipolíticas relacionadas con las familias IV y VI (Tabla 24). Dentro de este grupo se incluiría a la esterasa clonada en el clon FOS 155. También se incluirían otras esterasas que muestran baja o ninguna similitud de secuencia con las anteriores: EstEP16, de origen metagenómico (Zhu *et al.*, 2013), junto con EstGtA2 y EstL5 de *Geobacillus thermodenitrificans* T2 (Charbonneau *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013).
- El segundo grupo estaría formado por dos esterasas de 499 aminoácidos y un peso molecular de 55 kDa (Ewis *et al.*, 2004; Soliman & Gaballa, 2013), y en él se podría incluir la esterasa del clon FOS 15.
- Un tercer grupo representado por una esterasa, EstC de *Geobacillus thermoleovorans* YN con un peso molecular de 75.4 kDa (Soliman & Gaballa, 2013), con similitud de secuencia con esterasas y peptidasas con función dual,
- Y por último, un cuarto grupo de lipasas de 417 aminoácidos (Kambourova *et al.*, 2003; Li & Zhang, 2005; Soliman *et al.*, 2007; Abdel-Fattah & Gaballa, 2008; Hamid *et al.*, 2009; Ebrahimpour *et al.*, 2011; Tayyab *et al.*, 2011; Gudiukaite *et al.*, 2014).

Ya que los fragmentos subclonados de los dos clones positivos presentaron una alta similitud con genomas de especies del género *Geobacillus*, se evaluó si este género era dominante respecto al origen de los clones positivos obtenidos, con el fin de determinar si el esfuerzo requerido para estudiar cada uno de estos clones positivos podría verse recompensado con el descubrimiento de enzimas relativamente nuevas, o que no guardarán tanta similitud con enzimas ya conocidas. Se siguieron dos estrategias diferentes: secuenciación de los extremos iniciales de los insertos clonados en los fósidos seguido de búsqueda de homología mediante BLASTn y amplificación por PCR de un fragmento del gen que codifica para la esterasa Est50 de *G. thermoleovorans*, con cebadores que anillan en regiones conservadas del gen.

En primer lugar se aislaron otros 22 clones positivos de la metagenoteca de cultivo de enriquecimiento, mediante agotamiento por siembra en estría, en placas *Petri* con medio LBC con tributirina. Se extrajeron los fósidos y se secuenciaron los extremos iniciales de los fragmentos empleando el cebador universal T7. Mediante una búsqueda BLASTn se observó que la mayoría de las secuencias obtenidas presentaba una alta similitud de secuencia nucleotídica con los genomas de cinco cepas diferentes del género *Geobacillus*: *Geobacillus* sp. Y412MC52, *Geobacillus* sp. Y412MC61, *Geobacillus* sp. C56-T3, *G. thermoleovorans* CCB_US3_UF5 y *Geobacillus kaustophilus* HTA426 (Tabla 25). El único clon que presentó secuencia con similitud con otros microorganismos fue el FOS19, con el genoma de *Bacillus halodurans* C-125. Esto supone un 96 % de secuencias analizadas que probablemente pertenecen a especies del género *Geobacillus*.

Tabla 25: Resumen de los mejores resultados de las búsquedas BLAST de las secuencias de los extremos iniciales de los clones positivos indicados, procedentes de la metagenoteca del cultivo de enriquecimiento, contra la base de datos “nucleotide collection (nt/nr)” del NCBI.

Clon	Identidad (cobertura)					
	<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC52, genoma completo. CP002442	<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC61, genoma completo. CP001794	<i>Geobacillus</i> sp. C56-T3, genoma completo. CP002050	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5, genoma completo. CP003125	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426, genoma completo. BA000043	<i>Bacillus halodurans</i> C-125, genoma completo. BA000004.
FOS1	90 % (90 %)	90 % (90 %)	90 % (90 %)	88 % (90 %)	88 % (90 %)	
FOS2	94 % (85 %)	94 % (85 %)	94 % (85 %)	95 % (81 %)	96 % (82 %)	
FOS3			97 % (99 %)	85 % (91 %)	97 % (99 %)	
FOS5	95 % (96 %)	95 % (96 %)	95 % (96 %)	95 % (96 %)	95 % (96 %)	
FOS9	93 % (60 %)	93 % (60 %)	93 % (60 %)	93 % (60 %)	93 % (60 %)	
FOS10	98 % (95 %)	98 % (95 %)	97 % (95 %)	92 % (45 %)	98 % (89 %)	
FOS11	86 % (63 %)	86 % (63 %)	85 % (63 %)	86 % (61 %)	95 % (63 %)	
FOS13	90 % (86 %)	90 % (86 %)	94 % (86 %)	81 % (85 %)	84 % (85 %)	
FOS14	92 % (95 %)	92 % (95 %)	90 % (95 %)			
FOS17	90 % (85 %)	90 % (85 %)	95 % (95 %)	82 % (83 %)	84 % (84 %)	
FOS18	88 % (90 %)	88 % (90 %)	88 % (90 %)	87 % (90 %)	87 % (90 %)	
FOS19						73 % (23 %)
FOS20	94 % (95 %)	94 % (95 %)	94 % (95 %)	93 % (95 %)	93 % (95 %)	
FOS22	89 % (93 %)	89 % (93 %)	89 % (93 %)	89 % (93 %)	89 % (93 %)	
FOS23	97 % (44 %)	97 % (44 %)	97 % (97 %)	99 % (97 %)	99 % (97 %)	
FOS24	99 % (97 %)	99 % (97 %)	99 % (97 %)	100 % (97 %)	100 % (97 %)	
FOS25			99 % (99 %)	73 % (95 %)	99 % (99 %)	
FOS28	94 % (97 %)	93 % (97 %)	93 % (97 %)	94 % (97 %)	94 % (97 %)	
FOS29	83 % (92 %)	83 % (92 %)	83 % (92 %)	83 % (93 %)	83 % (93 %)	
FOS32			77 % (70 %)		76 % (70 %)	
FOS70	91 % (95 %)	91 % (95 %)	91 % (95 %)	90 % (96 %)	90 % (96 %)	
FOS84	92 % (55 %)	92 % (55 %)		94 % (55 %)		

Además, las secuencias obtenidas de los clones FOS1 y FOS22 mostraron alta similitud a nivel de secuencia nucleotídica con los genes de enzimas lipolíticas siguientes: FOS1 con el gen de la carboxilesterasa termoestable Est50 de *Geobacillus stearothermophilus* (AY186196) (91 de identidad con 90 % de cobertura) y FOS22 con parte de la secuencia del gen de la esterasa EstA de *G. thermoleovorans* YN (DQ288886) (89 % de identidad con 93 % de cobertura).

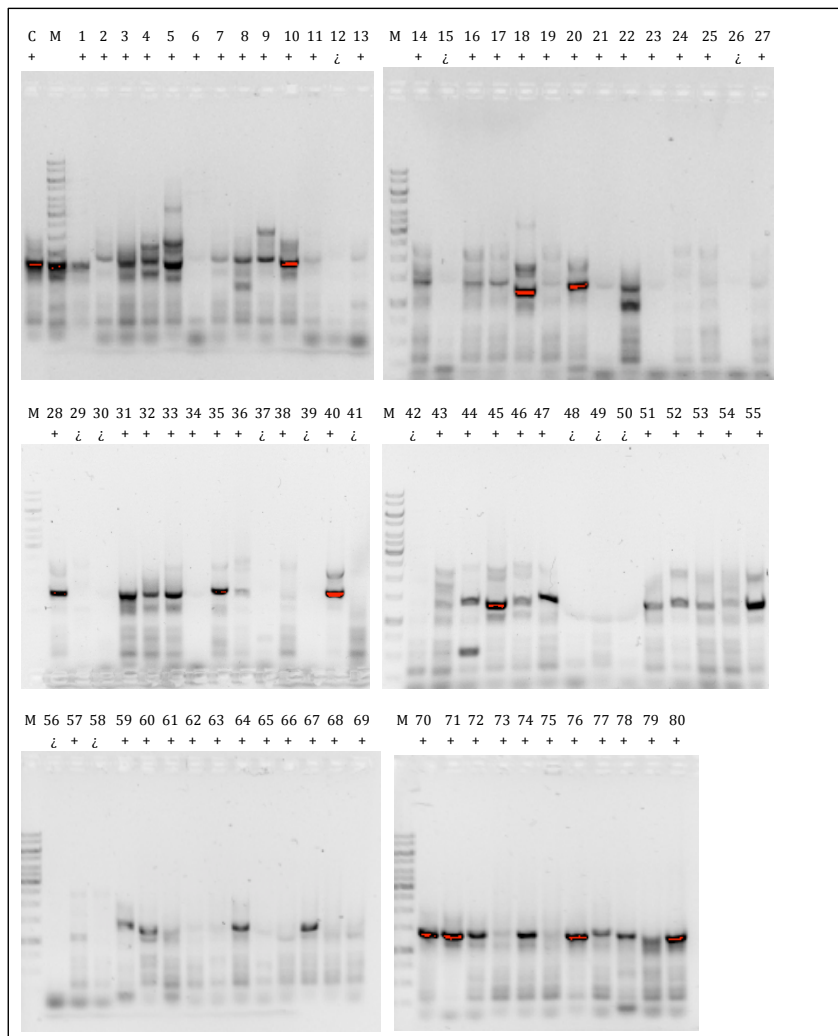


Figura 47: Electroforesis de los productos de amplificación por PCR de colonias de los clones positivos de la metagenoteca del cultivo de enriquecimiento con los cebadores para el gen Est50 de *Geobacillus stearothermophilus*. Tinción con GelGreen. M: marcador de pesos moleculares "GeneRuler 1kb DNA Ladder" (Fermentas); los números indican el número de clon positivo; + : presencia de banda de amplificación; ¿: resultado no concluyente. Continúa en la siguiente página.

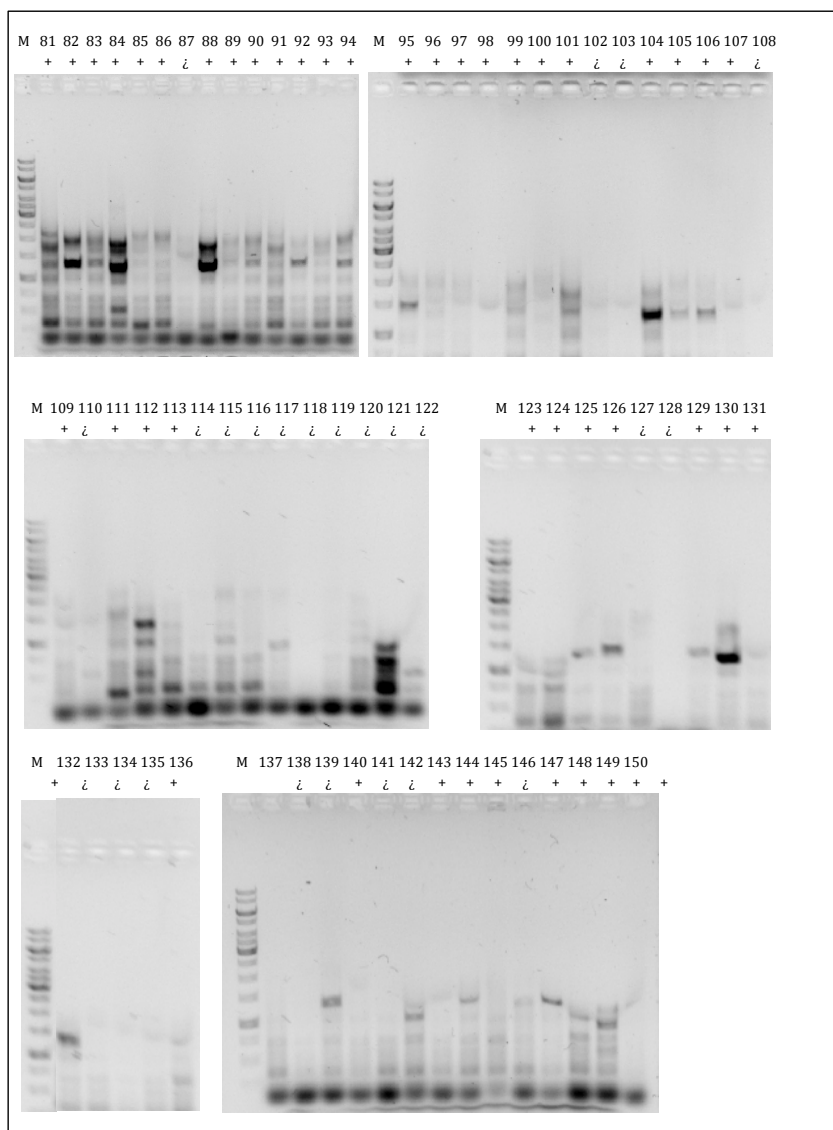


Figura 47, continuación: Electroforesis de los productos de amplificación por PCR de colonias de los clones positivos de la metagenoteca del cultivo de enriquecimiento con los cebadores para el gen Est50 de *Geobacillus stearothermophilus*. Tinción con GelGreen. M: marcador de pesos moleculares "GeneRuler 1kb DNA Ladder" (Fermentas); los números indican el número de clon positivo; + : presencia de banda de amplificación; ζ: resultado no concluyente. Continúa en la siguiente página.

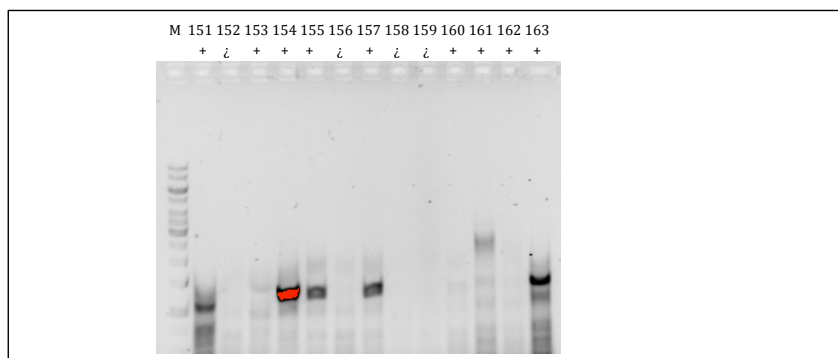


Figura 47, continuación: Electroforesis de los productos de amplificación por PCR de colonias de los clones positivos de la metagenoteca del cultivo de enriquecimiento con los cebadores para el gen Est50 de *Geobacillus stearothermophilus*. Tinción con GelGreen. M: marcador de pesos moleculares "GeneRuler 1kb DNA Ladder" (Fermentas); los números indican el número de clon positivo; + : presencia de banda de amplificación; ¿: resultado no concluyente.

En segundo lugar se realizaron amplificaciones por PCR de comprobación con unos cebadores diseñados para la secuencia codificante de la enzima Est50 de *G. stearothermophilus* (AY186196.1) que presentaba alta similitud con la secuencia presente en el extremo inicial del clon FOS1, y se analizaron los productos de amplificación por electroforesis. Al menos en el 74 % de los clones se obtiene el producto de amplificación esperado, de alrededor de 1200 pb (Fig. 47). En el resto hay algunos que no presentan ninguna banda y otros que presentan bandas, pero ninguna del tamaño esperado. Esto nos confirma la reducida diversidad de nuestra metagenoteca y que la mayoría de los clones positivos proceden de cepas relacionadas con el género *Geobacillus*.

En conclusión, aunque se haya detectado algún posible clon prometedor, como el FOS19, la mayoría de los positivos pertenecerían al género *Geobacillus*, del que ya han sido caracterizadas varias enzimas lipolíticas, por lo que su estudio se aplazó por el momento. Esto no significa que las enzimas detectadas en este estudio carezcan de interés, ya que entre enzimas caracterizadas muestran diferentes características a pesar de su gran similitud de secuencia, pero el objetivo principal era la búsqueda de enzimas nuevas, y se prefirió dedicar los recursos disponibles a la caracterización de los clones procedentes de la librería de aguas que se describe continuación.

3.4 Construcción de la metagenoteca de aguas termales y búsqueda funcional de actividad lipolítica

Se partió de un volumen de 25 L de aguas termales del manantial de Río Caldo (Ourense, España), que se filtraron por un filtro de 0.22 µm de tamaño de poro y se extrajo el ADN

metagenómico a partir de los filtros con el kit comercial *Metagenomic DNA Isolation Kit for water* (Epicentre). El ADN obtenido, a una concentración de 14 ng/μL ($A_{260/280} = 1.588$), fue del tamaño adecuado para su uso en la construcción de la metagenoteca, aproximadamente 40 kb (Fig. 48), lo que se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Se llevó a cabo la titulación de la metagenoteca para determinar la dilución adecuada que hay que emplear para infectar las células de *E. coli* EPI300 y obtener un número de colonias en torno a 120-150 en cada placa *Petri*. Se procedió a la infección con varias diluciones y se contaron las colonias obtenidas para cada una de ellas (Tabla 26).

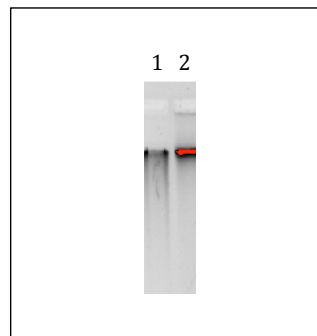


Figura 48: Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Tinción con Bromuro de etidio. Carriles: 1: ADN control 40kb (Epicentre); 2: ADN metagenómico de aguas termales.

Tabla 26: Titulación de la metagenoteca de aguas termales

Dilución	Recuento de colonias
0	662
1:10	62
1:100	7
1:1000	0

Tomando como referencia el valor observado en la dilución 1:10, calculamos la capacidad de la metagenoteca de fagos que es 6.2×10^4 ufc/mL. Finalmente se empleó una dilución 1:4 de la metagenoteca de fagos. Para la construcción de una genoteca se puede calcular el mínimo de clones necesarios para obtener una buena representación del genoma de un determinado microorganismo sabiendo el tamaño de su genoma. En metagenómica se parte de una muestra ambiental cuya diversidad se desconoce, y es difícil de estimar este número. En nuestro caso se atendió a cuestiones prácticas. Decidimos emplear un número de clones manejable, ya que la búsqueda de clones positivos se iba a realizar de manera manual, de modo que sembramos 45 placas, y obtuvimos una metagenoteca de aproximadamente 11600 clones.

Se realizaron cultivos de los clones de la genoteca en *E. coli*, de 5 en 5, en placas de 96 pocillos, y se trasladaron gotas de 5 μL a placas de LB con tributirina emulsionada suplementadas con cloranfenicol, que se dejaron crecer a 37°C durante 48 horas, y posteriormente se incubaron a 65°C al menos durante 6 h. La aparición de halos claros debido a la hidrólisis de la tributirina emulsionada reveló la presencia de enzimas lipolíticas. Se obtuvieron 7 clones positivos, con halos de hidrólisis (Fig. 49), por lo que la frecuencia de clones positivos fue de 0.06%. Con este valor se podría considerar que la genoteca es moderadamente rica en enzimas lipolíticas, ya que en algunos casos el

número de positivos puede llegar a ser menor del 0.01 % (Henne *et al.*, 2000). En un estudio similar al aquí descrito, a partir de sedimentos de un lago kárstico en España (Lago Arreo), en el que se realizó una búsqueda funcional entre 11520 clones empleando α -naftil acetato como sustrato, se identificaron 10 clones positivos, lo que supone una frecuencia de 0.087 %, similar a la de nuestro estudio (Martínez-Martínez *et al.*, 2013).

El clon positivo FOS 1 fue el que mostró halos de actividad más patentes, y que eran apreciables desde las 24 horas de incubación. Se intentó aislar para identificar el gen responsable de la actividad lipolítica, pero no fue posible. No se obtuvieron colonias con actividad al realizar el aislamiento, únicamente se llegaron a obtener unas colonias de tamaño muy pequeño al realizar incubación a 37°C prolongada, pero que no crecían al ser resemebradas en medio selectivo, por lo que se llegó a la conclusión de que o bien era una contaminación, o la proteína expresada podría ser tóxica para las células hospedadoras. El trabajo se continuó con el clon positivo FOS 4 que, exceptuando el clon 1, fue el más rápido en desarrollar un halo claro patente, a las 48 horas de incubación a 37°C (Fig. 49).

3.5 Selección, subclonación y análisis de la enzima lipolítica del clon FOS 4

Dado que en cada pocillo analizado en los ensayos de la búsqueda funcional había una mezcla de 5 clones, en primer lugar se aislaron colonias del clon positivo mediante agotamiento por siembra en estría en placa con medio sólido de LB-cloranfenicol con tributirina. El fósido de las colonias positivas (formando halos de hidrólisis) fue purificado, digerido con *SphI* y *EcoRI* (Fig. 50A) y los fragmentos resultantes subclonados en el plásmido pUC19, y transformados en la cepa de *E. coli* ECOS Blue. El inserto del subclon que mostró actividad lipolítica en placas LBA-tributirina se estimó de un tamaño aproximado de 5200 pb (Fig. 50A), y fue secuenciado por la técnica de “primer walking” con los cebadores indicados en la Tabla 23. Se predijeron 7 ORFs en la secuencia con la herramienta MetaGeneMark y se anotaron empleando BLASTp (Fig. 50B, Tabla 27). La ORF 3 mostró la similitud más alta (99% de cobertura y 64% de identidad) con la esterasa Est8, aislada por medio de metagenómica funcional a partir de suelos de Alemania (Nacke *et al.*, 2011). Est8 fue clasificada como una esterasa de la familia VIII de la clasificación de Arpigny y Jaeger (1999). La ORF3 mostró también una alta similitud de secuencia con β -lactamasas, característica distintiva de las esterases pertenecientes a esta familia. El gen que codifica para esa ORF 3 se denominó *LOB4Est* y fue identificado como el gen responsable de la actividad lipolítica del clon FOS 4.

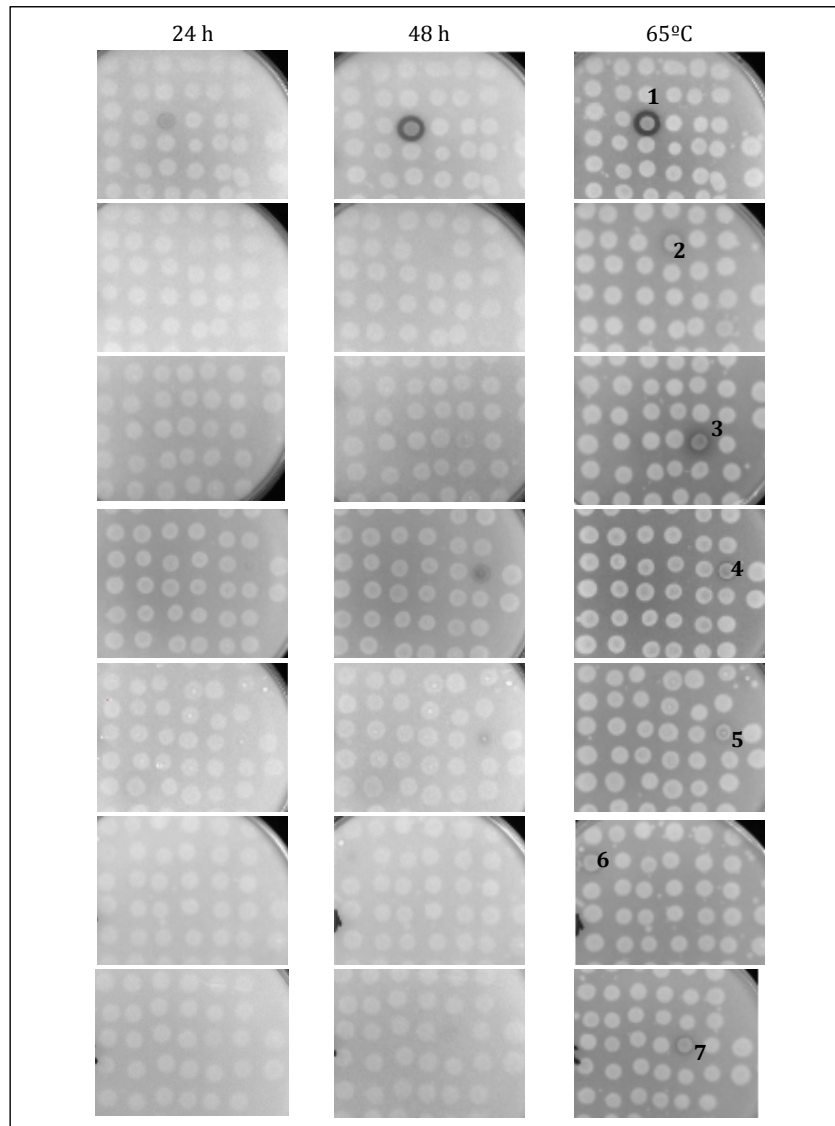


Figura 49: Imágenes de los clones positivos detectados en la búsqueda funcional a distintos tiempos de incubación: 24 y 48 h a 37°C, y aproximadamente 6 h a 65°C.

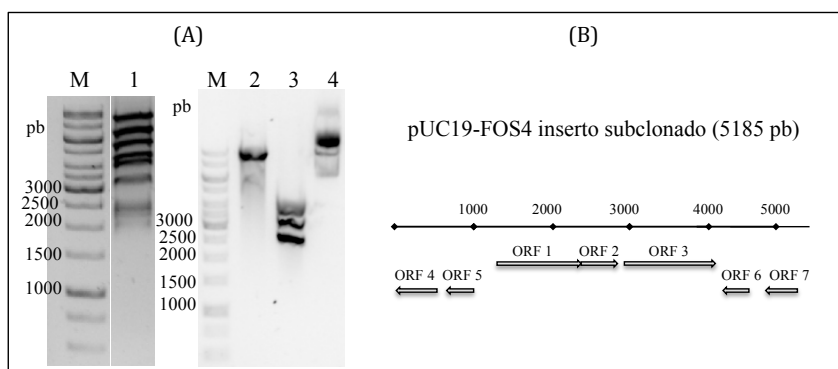


Figura 50: (A) Análisis por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% de: 1- digestión con SphI y EcoRI del fósido FOS 4, 2- digestión con EcoRI del subclon en pUC19; 3- digestión con SphI del subclon en pUC19; 4- subclon en pUC19 sin digerir. M: marcador de pesos moleculares "GeneRuler 1kb DNA Ladder" (Fermentas). Tinción con GelGreen. (B) Mapa físico del inserto de FOS4A subclonado en pUC19.

Tabla 27: Mejores resultados con la búsqueda BLASTp para las ORFs detectadas en el inserto de FOS4A subclonado.

ORF (pb)	Posible función, microorganismo	Número de acceso	% identidad (% cobertura)
ORF 1 (1254)	Proteína hipotética, <i>Desulfotomaculum</i> sp. BIC-A1/1_c6	WP_034102674	44 (84)
ORF 2 (459)	Alquil hidropéroxido reductasa, <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	WP_012629091	48 (80)
ORF 3 (1149)	esterasa Est8, microorganismo no cultivado del suelo	AEM45116	64 (99)
ORF 4 (513)	O-fosfoserina sulfhidrilasa, <i>Longispora albida</i>	WP_018348134	54 (100)
ORF 5 (339)	Regulador transcripcional de la familia ModE, <i>Acetohalobium arabaticum</i>	WP_013278309	43 (98)
ORF 6 (327)	Proteína hipotética, <i>Porphyromonas</i> sp. COT-290_OH3588CRE	KGN97422	32 (56)
ORF 7 (402)	Proteína hipotética, <i>Clostridiales</i> bacterium VE202-07	WP_024726181	55 (100)

La familia VIII de enzimas lipolíticas ha sido poco estudiada y su función fisiológica todavía es desconocida, pero podrían considerarse valiosos biocatalizadores, ya que varios miembros han destacado por presentar actividad sobre compuestos importantes para biotransformaciones industriales o que raramente son aceptados como sustratos por las enzimas lipolíticas estándar: alcoholes terciarios (industria farmacéutica) (Petersen et al. 2001, Rashamuse et al. 2009), alta enantioselectividad para (+)-metilacetato (industria alimentaria y perfumes) (Elend et al., 2006), el éster secundario 7-[3-octilcarboxi-(3-hidroxi-3-metil-butilo)]-cumarina (sustrato raramente aceptado

por otras enzimas) (Elend *et al.*, 2006) y ésteres de ácidos aril-carboxílicos (producción de aromas, fragancias, conservantes, entre otras aplicaciones) (Takehara *et al.*, 2012). Las esterases típicas de la familia VIII son de aproximadamente 380 aminoácidos, con un tamaño de 40 kDa, y muestran una alta similitud con β -lactamasas de clase C (Arpigny & Jaeger, 1999). El gen LOB4Est codifica para una proteína de 382 residuos y 40.47 kDa, con un pI de 5.58 lo que, junto con la similitud con β -lactamasas, sugiere que es una esterase de la familia VIII.

El alineamiento múltiple de la secuencia de la proteína LOB4Est con las secuencias de esterases conocidas de la familia VIII reveló la presencia de varios motivos conservados de β -lactamasas y transpeptidasas (Fig. 51).

La mayoría de las enzimas lipolíticas poseen la serina catalítica embebida en un pentapéptido conservado G-X-S-X-G, pero en LOB4Est está localizada en el motivo conservado S-X-X-K, entre las posiciones 65-69 (Fig. 51A), lo cual es típico de β -lactamasas de clase C (Knox *et al.*, 1996), proteínas de unión a penicilina (Joris *et al.*, 1988) y esterases de la familia VIII (Arpigny & Jaeger, 1999). En algunos miembros de la familia VIII se puede encontrar un motivo reminiscente G-X-S-X-G, pero no se detecta en la secuencia primaria de LOB4Est. No muestra similitud en las posiciones 147-151 con el motivo G-I-S-D-G detectado en EstB, ni en las posiciones 371-375 con el motivo G-M-S-E-G de EstC (Rashamuse *et al.*, 2009) (no mostrado); aunque muestra una ligera similitud en las posiciones 335-339 (G-A-G-G-S) con la secuencia de EstA (Fig. 51B), que se identificó mediante alineamiento de secuencia el peptapéptido parcialmente conservado (Schütte & Fetzner, 2007). Por tanto, LOB4Est no posee el peptapéptido G-X-S-X-G. Numerosos estudios han demostrado que la Ser de este motivo no contribuye a la catálisis en enzimas de la familia VIII (Petersen *et al.*, 2001; Elend *et al.*, 2006; Rashamuse *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2011). Pero, debido a la localización de este motivo, cercana al sitio catalítico, podría tener implicaciones en cuanto a la estabilidad térmica y especificidad de sustrato (Pérez *et al.*, 2012).

Se localizaron en la secuencia primaria de LOB4Est dos motivos altamente conservados de β -lactamasas de clase C que se sitúan en paredes opuestas de la cavidad catalítica (Wagner *et al.*, 2002), Y-A-N y K/H-T/S-G, localizados en el medio y en el extremo carboxilo-terminal, respectivamente. Sólo el residuo de Tyr en la posición 154, que actúa como base general (Schütte & Fetzner, 2007), estaba conservado en el motivo Y-A-N (Fig. 51C). El segundo motivo se localizó entre las posiciones 333-335 con la secuencia H-S-G (Fig. 51B). Además, una versión modificada del motivo L-L-X-H-X-X-G (Ranjan *et al.* 2005) se ha observado en las posiciones 110-116 (A-M-S-H-Q-A-G) (Fig. 51D), donde dos residuos de Lys fueron reemplazadas por Ala y Met, también detectado en Est8 (Nacke *et al.*, 2011).

(A)				(B)			
		*	*			*	
LOB4Est	57	PDTLFNSFSSTTKGVAATALHILA	79	329	T--AFGHSAGGSGTAFCDP	345	
Est8	57	ADTLFSPSSTTKGVAATALHILA	79	331	S--AFGHPGAGGSIAFADP	347	
Est01	60	RDTIFRMFSMSKPIITSIAVMQLI	82	346	KKCEFGWGGWLGWVVSVIP	364	
Est22	92	KDTIFRMASMTKPIASVALMMLY	114	371	TEGAVSWGCAFGTLFWVDP	389	
Est2K	95	EDSIFRIFSMTKPITGVALMMLY	117	372	SRGSYWWGIGGTWFWIDP	390	
EstA	51	PDSVTGVFSCSKGMAGLVAMLLV	73	316	SYRAFQHDGASASLGFDAP	334	
EstC	95	EDTLFRIYSMTKPVTVGVALMMLV	117	373	SEGSYWWGIGGTWFWIDP	391	
EstF4K	53	DDAIFRIASMTKPIVSVALMMLV	75	344	SNGDFYWGMYSTAFFIDP	362	
EstM-N1	55	DDAIYRIYSMTKPIVSVALMMLV	77	343	ADCEFGWGGAGTYFWVDP	361	
EstM-N2	66	EDSILRIYSMTKPIVSVALMMLV	88	355	SACSYFTGGLASTLFWVDP	373	
EstU1	92	AETIFRIYSMTKPIVSVALMMLV	114	375	SVGDLSWGAGGTWFWIDP	393	
Lpc53E1	50	TDTVGAIFSMKAITGAAAMQLV	72	333	PAGTLMWAGVLNSFFWIDR	351	
LR1	64	TDSIFRIYSMTKPIVSVALMMLV	86	335	SVGSYHWSGIGGTFFVDP	353	
PBS-2	58	DGAIMNLIYSMTKPIVSVALMMLV	80	327	PLGDFGWSGAGCMAIMDP	345	
SbLip1	90	PATMFRVASMTKPIVSVALMMLV	112	396	SDGTFGWSGVYGTFFVDP	414	
EstB	67	EDTLFRLASVTKPIVALAVLRIV	89	342	HAGTLQWSGVYGHWSFVDR	360	

(C)				(D)			
		**	*			*	
LOB4Est	142	GVPAPWPGTATGYHAIT	158	108	AQAMSQAAGLH	118	
Est8	139	GVPAPWPGTATGYHAIT	155	108	AQAMSQAAGLH	118	
Est01	172	LPLAFNPGDKWNYGFS	188	121	KNLDMTSLC	131	
Est22	200	LPLRYEPGTRWYSAAT	216	158	THILTHAGLM	168	
Est2K	207	LPLRQPGTQWYHVS	223	162	REEMSTGGLT	172	
EstA	136	LPLWKPATGFGYHALT	152	102	AQLLSRAGLL	112	
EstC	207	LPLRQPGTQWYHVS	223	162	REEMSTGGLT	172	
EstF4K	166	LPLEFDPGTQWYHVS	182	120	VDLRLTAGFT	130	
EstM-N1	162	LPLASCPGSRWYSLST	178	116	EDLTLRSQVS	126	
EstM-N2	179	LPLEFSPGERWYSLST	195	132	RDLFMSTGLT	142	
EstU1	206	LPLVYCPGTWYGHST	222	161	QDLMRSTGCT	171	
Lpc53E1	157	TPLAFDPGTQWYHVS	173	117	RNLTLTSTGFT	127	
LR1	170	LPLQFPGSVWYSRAT	186	125	QDLRLTAGLT	135	
PBS-2	157	LPLMFEPGTWYHVS	173	116	RDLFTMTAGFS	126	
SbLip1	232	TALEFPGSRWYSAQA	248	190	KDLTLTSTGLA	200	
EstB	167	LPLSFAPGSGWYSLAL	183	122	HHLTLTSTGLG	142	

Figura 51: Bloques del alineamiento múltiple de secuencia de la proteína LOB4Est con esterasas conocidas de la familia VIII (Arpigny & Jaeger, 1999) mostrando los motivos conservados: (A) S-X-X-K, (B) G-X-S-X-G, (C) Y-A-N, (D) K/H-T/S-G y (D) L-L-X-H-X-X-G. El fondo negro indica similitud >80%, y * indica identidad. Los números de acceso de las proteínas empleadas fueron: AEM45116.1 para Est8 (Nacke *et al.*, 2011), AEQ34089.1 para Est01 (Cheng *et al.*, 2014), AGT17593.1 para Est22 (Mokoena *et al.*, 2013), ACX51146.1 para Est2K (Kim *et al.*, 2010), CAD61039.1 para EstA (Schütte & Fetzner, 2007), ACH88047.1 para EstC (Rashamuse *et al.*, 2009), AEH57832.1 para EstF4K (Ouyang *et al.*, 2013), AEA07653.1 para EstM-N1 (Yu *et al.*, 2011), AEA07655.1 para ESTM-N2 (Yu *et al.*, 2011), AFU54388.1 para EstU1 (Joon *et al.*, 2011), AFM09717.1 para Lpc53E1 (Selvin *et al.*, 2012), AAZ32715.1 para LR1 (Ranjan *et al.*, 2005), AHL66978.1 para PBS-2 (Kim *et al.*, 2014), AFK83589.1 para SbLip1 (Biver & Vandenbol, 2013) y AAF59826.1 para EstB (Wagner *et al.*, 2002).

3.6 Clonación, expresión heteróloga y caracterización bioquímica de la nueva enzima lipolítica LOB4Est

El gen *LOB4Est* se amplificó mediante PCR empleando los cebadores YFF4A3F y YFF4A3R (Tabla 22), y se clonó en el plásmido YEpFLAG-1 linearizado por medio de recombinación homóloga en *S. cerevisiae*. Los plásmidos fueron extraídos de las levaduras, se amplificaron en bacterias y se secuenciaron para confirmar que la

construcción era correcta. El plásmido recombinante se denominó YF-LOB4Est, y la cepa de levadura que lo contenía Sc-LOB4Est.

Para verificar la producción y la secreción de LOB4Est por la cepa Sc-LOB4Est, se realizó un pequeño cultivo de 2 mL en YPHSM, y se analizó el sobrenadante y el extracto crudo mediante SDS-PAGE y Western blot. Se observó una banda de aproximadamente 40 kDa en ambas muestras, en concordancia con el peso molecular estimado para la proteína (Fig. 52). Se observó una segunda banda en el extracto crudo, que se podría corresponder con una pre-proteína, en la que la enzima está fusionada con la señal de secreción del factor α , codificado por la secuencia del plásmido, que añade 23 kDa al peso molecular de la proteína.

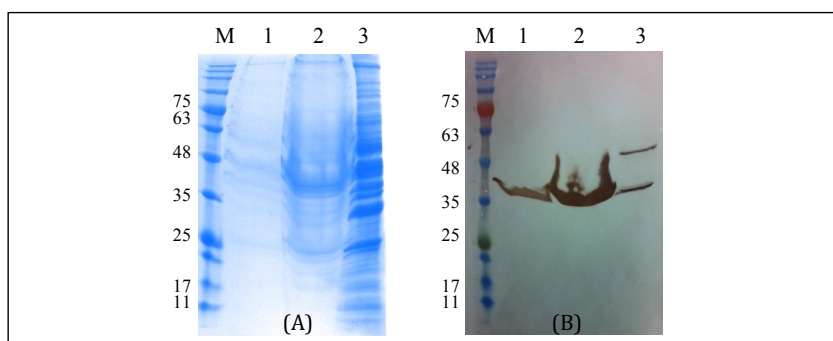


Figura 52: Análisis por SDS-PAGE, tinción con azul de Coomassie (A) y Western blot con anticuerpo monoclonal anti-FLAG-M2 (B), de diferentes fracciones de un cultivo de la cepa Sc-LOB4Est: 1- sobrenadante, 2- sobrenadantes concentrado 8X, 3- extracto crudo. M: marcador de pesos moleculares NZYcolour Protein Marker II (ENZYTech).

La actividad lipolítica de la enzima se caracterizó a partir del sobrenadante de cultivos de 2 mL y de 72 h de incubación, inoculados con una pequeña cantidad de células de la cepa Sc-LOB4Est.

La enzima recombinante mostró una actividad óptima a pH 7.5 (Fig. 53A) y 40°C (Fig. 53B), dentro de rango de condiciones ensayadas. El perfil de actividad mostraba un pico a pH 7.5, pero la enzima permanecía altamente activa (por encima del 80% de actividad) en el rango de pH de 6.5-8, y moderadamente activa (por encima de 50%) en el rango de 6-8.5. A pesar de su origen termófilo, la enzima es más activa a temperaturas mesófilas y la actividad cae a temperaturas superiores a 40°C, alcanzando el 50% de su máxima actividad a 50°C. Esto concuerda con el comportamiento del clon en la búsqueda funcional inicial, en placas con tributirina, siendo el primero en mostrar halo de hidrólisis en la incubación a 37°C.

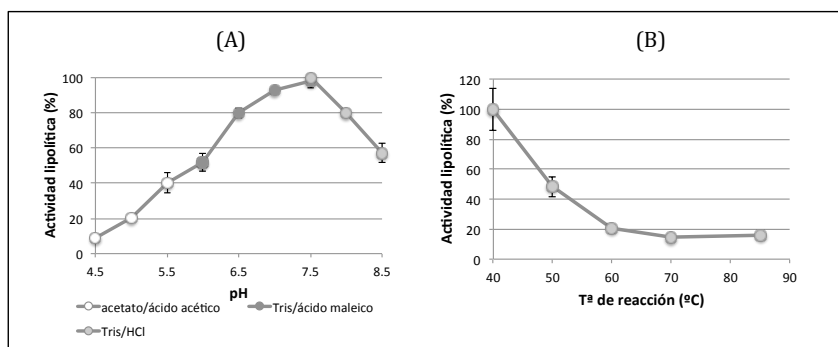


Figura 53: Actividad relativa de la enzima recombinante a diferentes valores de pH (A) y temperatura (B). Los datos muestran media \pm desviación estándar. N = 3.

Pero la actividad a altas temperaturas no es la única característica de importancia en enzimas termófilas. La termoestabilidad también es de interés, especialmente en términos de costes económicos de los procesos de biotransformación. La actividad residual de la enzimas se midió tras la incubación a 50 y 60°C durante diferentes intervalos de tiempo (Fig. 54). Después de 45 y 90 min de incubación a 60°C, la enzima recombinante retiene el 36 y 10 % de la actividad inicial, respectivamente, mientras que tras 2 h a 50°C aún muestra el 44 % de actividad. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo de primer-orden:

$$LA(t) = LA_0 e^{-kt}$$

Donde $LA(t)$ representa la actividad lipolítica a tiempo t expresada como porcentaje de la actividad lipolítica inicial (LA_0), y k es la constante térmica de desactivación.

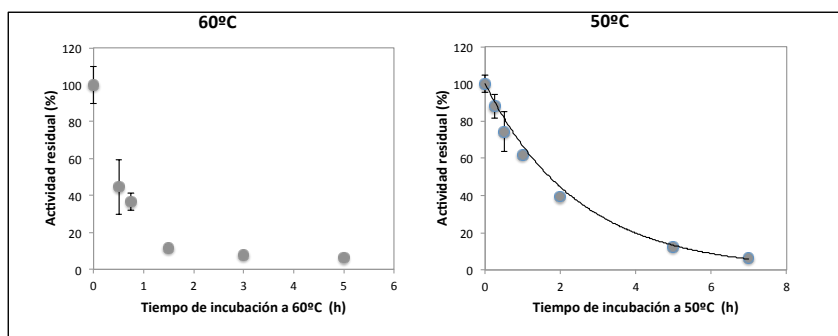


Figura 54: Actividad residual de la enzima LOB4Est tras incubar a 60 y 50°C, y modelo de desactivación térmica de primer orden a 50°C. Los datos muestran media \pm desviación estándar. N = 3.

El perfil de desactivación de la enzima recombinante a 50°C muestra un buen ajuste al modelo de primer orden (Tabla 28), con una vida media de 1 h 43 min, lo que sugiere que nuestra enzima muestra un moderado grado de termoestabilidad a 50°C.

Los microorganismos que viven en ambientes sometidos a temperaturas extremas, altas o bajas, han adaptado cada componente de su maquinaria celular para sobrevivir bajo estas circunstancias (Ferrer *et al.*, 2007). Por ello las enzimas lipolíticas aisladas a partir de manantiales termales suelen ser termoestables y mostrar una alta actividad de acuerdo con la temperatura del ambiente del que proceden. La proteína LOB4Est, con actividad a temperaturas mesófilas y moderadamente termoestable, es una de las escasas excepciones que se pueden encontrar en la literatura. Como ejemplos tenemos una lipasa aislada de un manantial termal en la India que era termolábil a temperatura ambiente (Sharma *et al.*, 2012), y también una esterasa aislada en la Antártida, que mostraba una temperatura óptima de 40°C (Heath *et al.*, 2009). En este mismo trabajo se observó que la esterasa de *T. thermophilus* HB27 expresada en levaduras presentó mayor actividad a 40°C, mientras que la temperatura óptima de la enzima nativa es de 80°C, pero en este caso este fenómeno fue atribuido a la modificación del extremo amino terminal de la proteína (López-López *et al.*, 2010; Fuciños *et al.*, 2011).

Tabla 28: Estimaciones de los parámetros y coeficientes de regresión del modelo de desactivación de primer orden (1) aplicado a la desactivación térmica de la enzima LOB4Est incubada a 50°C y el modelo Michaelis-Menten.

Modelo de primer orden			Modelo Michaelis-Menten		
t ½ (h)	k (h ⁻¹)	r ²	V _{max} (U/L)	K _m (mM)	r ²
1.71	0.405	0.993	263.778	0.298	0.965

La preferencia de sustrato se evaluó empleando p-nitrofenil ésteres con diferente longitud de cadena lateral: pNP6, pNP8 y pNP12. La enzima recombinante mostró una preferencia hacia los sustratos con cadena lateral corta (Fig. 55A), siendo la actividad en pNP6 más del doble de la actividad con pNP12, lo cual confirma que la enzima se trata de una esterasa. La mayoría de las esterases caracterizadas de la familia VIII mostraron una marcada preferencia con los sustratos de cadena lateral corta, y sólo unas pocas mostraron actividad relevante con sustratos de cadena lateral de 10 o más carbonos (Kim *et al.*, 2010; Selvin *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2012; Ouyang *et al.*, 2013; Mokoena *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014). Por tanto, LOB4Est es un miembro inusual de la familia VIII con una preferencia amplia de sustratos con cadena lateral de longitud media. La autohidrólisis de los sustratos de menor longitud de cadena fue elevada (sobre todo de pNP4, con el que no fue posible realizar la medición), por lo que pNP12 fue el sustrato empleado para medir la producción y realizar la caracterización bioquímica de la enzima. Las velocidades iniciales de reacción de LOB4Est fueron medidas a diferentes concentraciones de pNP12 y el perfil se ajustó a una curva de Michaelis-Menten (Fig. 55B), el modelo cinético típico de esterases. Los parámetros de ajuste se muestran en la Tabla 28.

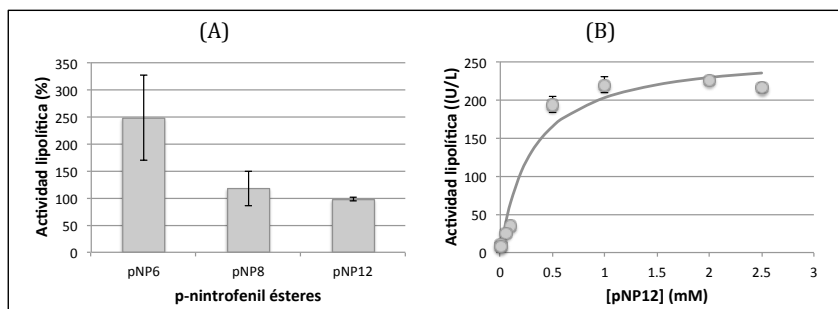


Figure 55: Preferencia de sustrato (A) y cinética Michaelis-Menten usando pNP12 como sustrato (B). Los datos muestran media \pm desviación estándar. N = 3.

Dada la similitud de secuencia con enzimas β -lactamasas, se ensayó la actividad β -lactamasa empleando medio extracelular sin diluir de cultivos de la cepa Sc-LOB4Est y la cepa control (transformada con el vector vacío). Aunque la actividad es ligeramente superior en la cepa Sc-LOB4Est que en el control, ambos niveles son muy bajos y la diferencia no es estadísticamente significativa aplicando la prueba t-Student ($p = 0.05$) (Fig. 56). Este resultado no es sorprendente puesto que la mayoría de las esterasas de la familia VIII carecen de actividad β -lactamasa, incluso mostrando similitud de secuencia con las mismas. Sólo seis miembros de esta familia muestran actividad β -lactamasa relevante, EstA3 (Elend *et al.*, 2006), EstC (Rashamuse *et al.*, 2009), EstU1 (Jeon *et al.*, 2011), EstM-N1, EstM-N2 (Yu *et al.*, 2011) y PBS-2 (Kim *et al.*, 2014).

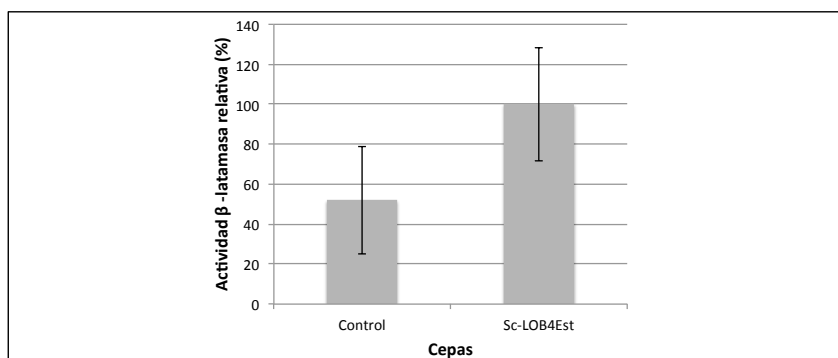


Figure 56: Actividad β -lactamasa relativa del medio extracelular de cultivos de las cepas Sc-LOB4Est y control (*S. cerevisiae* BJ3505 con el plásmido YEpFLAG-1 vacío). Los datos muestran media \pm desviación estándar. N = 3.

Hay dos estructuras disponibles de los miembros EstB y EstU1 de la familia VIII de esterasas, y ambas muestran una disposición de los residuos del sitio activo similar a la de β -lactamasas, pero únicamente EstU1 presenta bajos niveles de actividad β -lactamasa

(Jeon *et al.*, 2011). La ausencia de actividad en esterases de la familia VIII podría deberse, como en Est B, a factores estéricos (Wagner *et al.*, 2002). El túnel del sitio activo de EstB es más estrecho que en β -lactamasas con plegamiento similar. La comparación de ambas estructuras ha permitido identificar dos regiones, un *loop* Ω y un segmento denominado R1, cuya longitud y conformación parece ser responsable de las diferentes actividades β -lactamasas de las esterases de la familia VIII (Cha *et al.*, 2013). Las regiones de cierta longitud bloquearían el acceso al sitio activo de sustratos voluminosos, impidiendo la actividad β -lactamasa. Estas regiones son más cortas en EstU1 (42 y 30 aminoácidos, respectivamente) que en EstB (58 y 32 aminoácidos respectivamente), y en la enzima EstC, que presenta alta actividad β -lactamasa son aún más cortas (44 y 30 aminoácidos, respectivamente) (Rashamuse *et al.*, 2009). En el caso de la proteína LOBS4Est presenta un *loop* Ω de 19 aminoácidos de longitud pero el segmento R1 es de 62 aminoácidos, y precisamente la longitud de este segmento podría ser el motivo de la ausencia de actividad β -lactamasa de dicha enzima (Fig. 57).

		Segmento R1	
Lob4Est	113	HQAGLHAMPTPST-----IETLCD131	
EstU1	166	HTSGITYGFVGDG---LVKKAY--IASNLFDGDFD195	
EstC	167	HTGGLTYGMFSRS---QVDSMY--VAANILDANGT196	
EstB	127	HTSGLGYWLLEGAG---SVYDRLGISDGIDLRDFD158	
		Loop Ω	
LOB4Est	194	FVGIEGVEDRLATLAVPAP--GEGMALP---IPPDHDFFKAMPSSLGGHVYNDMRVRRACLPSANG255	
EstU1	256	FYVTDPAKKSLVAEAMPNDRKIGG-----SEMFDPVQKKWEFPGGQG297	
EstC	257	FGVA-DEDRARFAKMYQSTPNG-----LQAPGDALGGDYDPATFFGGGGG301	
EstB	219	FVSAEPEPFAVPYHDGQPEFVRMRDGI EVP-----LPEGHGA AVRFAPSRVFEPGAYPSSGGAG276	

Figura 57: Alineamiento múltiple de las regiones responsables de la presencia/ausencia actividad β -lactamasa en la proteína LOB4Est y distintos miembros de la familia VIII: EstU1 (Jeon *et al.*, 2011), EstC (Rashamuse *et al.*, 2009) y EstB (Wagner *et al.*, 2002).

Una vez establecidas las condiciones óptimas para medir la actividad lipolítica se estudió la producción de la enzima recombinante. En la figura 58A se muestra el perfil de crecimiento y producción extracelular de actividad lipolítica de un cultivo de la cepa Sc-LOB4Est.

A pesar de que el medio de cultivo YPHSM está formulado para obtener una máxima expresión a las 72 horas de incubación, la cepa Sc-LOB4Est aumenta rápidamente la producción de enzima en la franja de tiempo de 72 a 96 h, quintuplicando los valores de actividad en el sobrenadante y alcanzando 145 U/L. La producción a partir de ese momento sigue aumentando aunque a un ritmo más lento, hasta alcanzar las 180 U/L a las 120 h. En un nuevo cultivo se midió la actividad de las distintas fracciones celulares a las 96 horas de cultivo, y se observó que unan gran parte de la enzima expresada quedaba retenida a nivel celular, concretamente un 56% se localizaba en la fracción periplásmica, mientras que el 36 % es secretado al medio extracelular (Fig. 58B). Por tanto, la producción total de enzima en ese momento duplicaría la cantidad de enzima secretada al medio de cultivo. Esto representa una mejor eficiencia de secreción que la obtenida para la esterasa de *T. thermophilus* HB27 empleando el mismo sistema de

expresión, en el que sólo el 20% de la proteína era secretada al medio extracelular (López-López *et al.*, 2010).

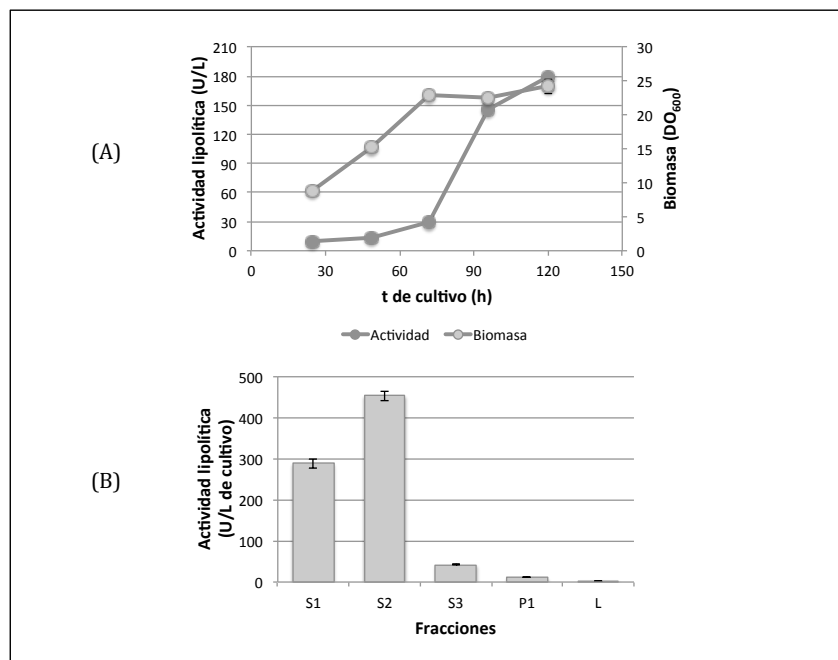


Figura 58: (A) Producción de actividad lipolítica de Sc-LOB4Est en cultivo. (B) Actividad lipolítica de las fracciones celulares en un cultivo de Sc-LOB4Est. S1: Fracción extracelular, S2: Fracción periplásmica, S3: fracción citoplasmática, P1: restos celulares, L: lavados. Los datos muestran media \pm desviación estándar. N = 3.

4. Conclusiones

Se han construido dos metagenotecas a partir de muestras del manantial termal de Rio Caldo, empleando el fósido pCC1FOS, y se sometieron a búsqueda funcional de enzimas lipolíticas.

La primera de ellas, de 9210 clones, se construyó a partir de un cultivo de enriquecimiento, inoculado con sedimentos del manantial termal. En ella se detectaron 161 clones positivos. Se estimó que la mayoría procedían de especies del género *Geobacillus*, muchas de cuyas enzimas lipolíticas han sido previamente caracterizadas.

La segunda de ellas, de 11600 clones, se construyó a partir de la población microbiana de aguas termales. En ella se han detectado 6 clones con actividad lipolítica. El clon FOS4 fue seleccionado para su estudio por ser el primero en mostrar halos de actividad lipolítica en la búsqueda funcional. Contenía el gen LOB4Est, que codificaba para una nueva esterasa moderadamente termoestable de la familia VIII, con similitud de secuencia con β -lactamasas, una especificidad de sustrato de inusual amplitud y actividad máxima a 40°C y pH 7.5 en el rango de las condiciones ensayadas.

5. Referencias

Abdel-Fattah, Y.R., Gaballa, A.A. (2008). Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli*. Microbiological Research 163 (1): 13-20.

Altschul, S.F. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. Journal of Molecular Biology 215 (3): 403-410.

Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews 59 (1): 143-169.

Arpigny, J.L., Jaeger, K.-E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. Biochemical Journal 343 (1): 177-183.

Bell, P.J.L., Sunna, A., Gibbs, M.D., Curach, N.C., Nevalainen, H., Bergquist, P.L. (2002). Prospecting for novel lipase genes using PCR. Microbiology 148 (8): 2283-2291.

Beloqui, A., Polaina, J., Vieites, J.M., Reyes-Duarte, D., Torres, R., Golyshina, O.V., et al. (2010). Novel hybrid esterase-haloacid dehalogenase enzyme. ChemBioChem 11 (14): 1975-1978.

Berlemont, R., Pipers, D., Delsaute, M., Angiono, F., Feller, G., Galleni, M., et al. (2011). Exploring the antarctic soil metagenome as a source of novel cold-adapted enzymes and genetic mobile elements. Revista Argentina de Microbiología 43(2): 94-103.

Besemer, J., Borodovsky, M. (1999). Heuristic approach to deriving models for gene finding. Nucleic Acids Research 27 (19): 3911-3920.

Biver, S., Vandenbol, M. (2013). Characterization of three new carboxylic ester hydrolases isolated by functional screening of a forest soil metagenomic library. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 40 (2): 191-200.

- Cha, S.-S., An, Y.J., Jeong, C.-S., Kim, M.-K., Jeon, J.H., Lee, C.-M., et al.** (2013). Structural basis for the β -lactamase activity of EstU1, a family VIII carboxylesterase. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 81 (11): 2045-2051.
- Charbonneau, D.M., Meddeb-Mouelhi, F., Beauregard, M.** (2010). A novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus thermodenitrificans*: Evidence for a new carboxylesterase family. *Journal of Biochemistry* 148 (3): 299-308.
- Cheng, X., Wang, X., Qiu, T., Yuan, M., Sun, J., Gao, J.** (2014). Molecular cloning and characterization of a novel cold-adapted family VIII esterase from a biogas slurry metagenomic library. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (11): 1484-1489.
- Chow, J., Kovacic, F., Dall Antonia, Y., Krauss, U., Fersini, F., Schmeisser, C., et al.** (2012). The metagenome-derived enzymes LipS and LipT increase the diversity of known lipases. *PLoS ONE* 7 (10): e476665.
- Chu, X., He, H., Guo, C., Sun, B.** (2008). Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (4): 615-625.
- Côté, A., Shareck, F.** (2010). Expression and characterization of a novel heterologous moderately thermostable lipase derived from metagenomics in *Streptomyces lividans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37 (9): 883-891.
- Cowan, D., Meyer, Q., Stafford, W., Muyanga, S., Cameron, R., Wittwer, P.** (2005). Metagenomic gene discovery: Past, present and future. *Trends in Biotechnology* 23 (6): 321-329.
- Deive, F.J., Álvarez, M.S., Sanromán, M.A., Longo, M.A.** (2013). North Western Spain hot springs are a source of lipolytic enzyme-producing thermophilic microorganisms. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36 (2): 239-250.
- Ebrahimipour, A., Rahman, R.N., Basri, M., Salleh, A.B.** (2011). High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM. *Bioresource Technology* 102 (13): 6972-6981.
- Elend, C., Schmeisser, C., Leggewie, C., Babiak, P., Carballeira, J.D., Steele, H.L., et al.** (2006). Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Applied Environmental Microbiology* 72 (5): 3637-3645.
- Elend, C., Schmeisser, C., Hoebenreich, H., Steele, H.L., Streit, W.R.** (2007). Isolation and characterization of a metagenome-derived and cold-active lipase with high stereospecificity for (R)-ibuprofen esters. *Journal of Biotechnology* 130 (4): 370-377.

- Ewis, H.E., Abdelal, A.T., Lu, C.-D.** (2004). Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus*. *Gene* 329 (1-2): 187-195.
- Fan, X., Liu, X., Wang, K., Wang, S., Huang, R., Liu, Y.** (2011). Highly soluble expression and molecular characterization of an organic solvent-stable and thermotolerant lipase originating from the metagenome. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72 (3-4): 319-325.
- Faoro, H., Glogauer, A., Souza, E.M., Rigo, L.U., Cruz, L.M., Monteiro, R.A., et al.** (2011). Identification of a new lipase family in the Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. *Environmental Microbiology Reports* 3 (6): 750-755.
- Ferrer, M., Golyshina, O.V., Chernikova, T.N., Khachane, A.N., Dos Santos, V.A.P.M., Yakimov, M.M., et al.** (2005). Microbial enzymes mined from the Urania deep-sea hypersaline anoxic basin. *Chemistry and Biology* 12 (8): 895-904.
- Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., Golyshin, P.N.** (2007). Mining enzymes from extreme environments. *Current Opinion in Microbiology* 10 (3): 207-214.
- Ferrer, M., Beloqui, A., Timmis, K.N., Golyshin, P.N.** (2008). Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16 (1-2): 109-123.
- Fu, C., Hu, Y., Xie, F., Guo, H., Ashforth, E.J., Polyak, S.W., et al.** (2011). Molecular cloning and characterization of a new cold-active esterase from a deep-sea metagenomic library. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90 (3): 961-970.
- Fuciños, P., Atanes, E., López-López, O., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I., Pastrana, L., et al.** (2011). Production and characterization of two N-terminal truncated esterases from *Thermus thermophilus* HB27 in a mesophilic yeast: Effect of N-terminus in thermal activity and stability. *Protein Expression and Purification* 78 (2): 120-130.
- Gabor, E.M., Alkema, W.B.L., Janssen, D.B.** (2004). Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environmental Microbiology* 6 (9): 879-886.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A.** (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server en *The Proteomics Protocols Handbook* editado por John M. Walker. Humana Press.
- Glogauer, A., Martini, V., Faoro, H., Couto, G., Müller Santos, M., Monteiro, R., et al.** (2011). Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial Cell Factories* 10 (1): 54.

Godzik, A. (2011). Metagenomics and the protein universe. *Current Opinion in Structural Biology* 21 (3): 398-403.

González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Araujo-Nespereira, P., Cid-Fernández, J.A., Simal-Gándara, J. (2009). Occurrence of soluble organic compounds in thermal waters by ion trap mass detection. *Chemosphere* 75 (1): 34-47.

Gudiukaite, R., Gegeckas, A., Kazlauskas, D., Citavicius, D. (2014). Influence of N- and/or C-terminal regions on activity, expression, characteristics and structure of lipase from *Geobacillus* sp. 95. *Extremophiles* 18 (1): 131-145.

Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology* 89 (1): 17-34.

Hamid, T.H.T.A., Eltaweel, M.A., Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M., Salleh, A.B. (2009). Characterization and solvent stable features of Strep-tagged purified recombinant lipase from thermostable and solvent tolerant *Bacillus* sp. strain 42. *Annals of Microbiology* 59 (1): 111-118.

Heath, C., Xiao, P.H., Cary, S.C., Cowan, D. (2009). Identification of a novel alkaliphilic esterase active at low temperatures by screening a metagenomic library from antarctic desert soil. *Applied Environmental Microbiology* 75 (13): 4657-4659.

Henke, E., Bornscheuer, U.T. (2003). Esterases from *Bacillus subtilis* and *B. stearothermophilus* share high sequence homology but differ substantially in their properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (3): 320-326.

Henne, A., Schmitz, R.A., Bömeke, M., Gottschalk, G., Daniel, R. (2000). Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology* 66 (7): 3113-3116.

Hu, Y., Fu, C., Yin, Y., Cheng, G., Lei, F., Yang, X., et al. (2010). Construction and preliminary analysis of a deep-sea sediment metagenomic fosmid library from Qiongdongnan Basin, South China Sea. *Marine Biotechnology* 12 (6): 719-727.

Hu, X.P., Heath, C., Taylor, M.P., Tuffin, M., Cowan, D. (2012). A novel, extremely alkaliphilic and cold-active esterase from Antarctic desert soil. *Extremophiles* 16 (1): 79-86.

Jeon, J.H., Kim, S.-J., Lee, H.S., Cha, S.-S., Lee, J.H., Yoon, S.-H., et al. (2011). Novel metagenome-derived carboxylesterase that hydrolyzes β -lactam antibiotics. *Applied Environmental Microbiology* 77 (21): 7830-7836.

- Jeon, J.H., Lee, H.S., Kim, J.T., Kim, S.-J., Choi, S.H., Kang, S.G., et al.** (2012). Identification of a new subfamily of salt-tolerant esterases from a metagenomic library of tidal flat sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (2): 623-631.
- Joris, B., Ghuysen, J.M., Dive, G., Renard, A., Dideberg, O., Charlier, P., et al.** (1988). The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 DD-peptidase family. *Biochemical Journal* 250 (2): 313-324.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A.** (2003). Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22 (5-6): 307-313.
- Kang, C.-H., Oh, K.-H., Lee, M.-H., Oh, T.-K., Kim, B.H., Yoon, J.-H.** (2011). A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library. *Microbial Cell Factories* 10: 41.
- Kennedy, J., O'Leary, N.D., Kiran, G.S., Morrissey, J.P., O'Gara, F., Selvin, J., et al.** (2011). Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *Journal of Applied Microbiology* 111 (4): 787-799.
- Kim, J.-N., Seo, M.-J., Cho, E.-A., Lee, S.-J., Kim, S.-B., Cheigh, C.-I., et al.** (2005). Screening and characterization of an esterase from a metagenomic library. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15 (5): 1067-1072.
- Kim, E.-Y., Oh, K.-H., Lee, M.-H., Kang, C.-H., Oh, T.-K., Yoon, J.-H.** (2009). Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. *Applied Environmental Microbiology* 75 (1): 257-260.
- Kim, Y.H., Kwon, E.J., Kim, S.K., Jeong, Y.S., Kim, J., Yun, H.D., et al.** (2010). Molecular cloning and characterization of a novel family VIII alkaline esterase from a compost metagenomic library. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393 (1): 45-49.
- Kim, Y.-O., Park, I.-S., Nam, B.-H., Kim, D.-G., Jee, Y.-J., Lee, S.-J., et al.** (2014). A novel esterase from *Paenibacillus* sp. PBS-2 is a new member of the β -lactamase belonging to the family VIII lipases/esterases. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (9): 1260-1268.
- Knox, J.R., Moews, P.C., Frere, J.-M.** (1996). Molecular evolution of bacterial β -lactam resistance. *Chemistry and Biology* 3 (11): 937-947.
- Ko, K.-C., Rim, S.-O., Han, Y., Shin, B.S., Kim, G.-J., Choi, J.H., et al.** (2012). Identification and characterization of a novel cold-adapted esterase from a metagenomic

library of mountain soil. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39 (5): 681-689.

Kouker, G., Jaeger, K.-E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied Environmental Microbiology* 53 (1): 211-213.

Lämmle, K., Zipper, H., Breuer, M., Hauer, B., Buta, C., Brunner, H., et al. (2007). Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *Journal of Biotechnology* 127 (4): 575-592.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21): 2947-2948.

Lawrence, R.C., Fryer, T.F., Reiter, B. (1967). Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature* 213(5082):1264-1265.

Lee, M.-H., Lee, C.-H., Oh, T.-K., Song, J.K., Yoon, J.-H. (2006). Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: Evidence for a new family of bacterial lipases. *Applied Environmental Microbiology* 72 (11): 7406-7409.

Lewin, A., Wentzel, A., Valla, S. (2013). Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments. *Current Opinion in Biotechnology* 24 (3): 516-525.

Li, H., Zhang, X. (2005). Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein Expression and Purification* 42 (1): 153-159.

López-López, O., Fuciños, P., Pastrana, L., Rúa, M.L., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I. (2010). Heterologous expression of an esterase from *Thermus thermophilus* HB27 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* 145 (3): 226-232.

Martínez-Martínez, M., Alcaide, M., Tchigvintsev, A., Reva, O., Polaina, J., Bargiela, R., et al. (2013). Biochemical diversity of carboxyl esterases and lipases from lake arreo (Spain): A metagenomic approach. *Applied Environmental Microbiology* 79 (12): 3553-3562.

Meilleur, C., Hupé, J.-F., Juteau, P., Shareck, F. (2009). Isolation and characterization of a new alkali-thermostable lipase cloned from a metagenomic library. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36 (6): 853-861.

Milshteyn, A., Schneider, J.S., Brady, S.F. (2014). Mining the metabiome: Identifying novel natural products from microbial communities. *Chemistry and Biology* 21 (9): 1211-1223.

- Mokoena, N., Mathiba, K., Tsekoa, T., Steenkamp, P., Rashamuse, K.** (2013). Functional characterisation of a metagenome derived family VIII esterase with a deacetylation activity on β -lactam antibiotics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 437 (3): 342-348.
- Montoro-García, S., Martínez-Martínez, I., Navarro-Fernández, J., Takami, H., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, Á.** (2009). Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 shows the existence of a new carboxylesterase family. *Journal of Bacteriology* 191 (9): 3076-3085.
- Nacke, H., Will, C., Herzog, S., Nowka, B., Engelhaupt, M., Daniel, R.** (2011). Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories. *FEMS Microbiology Ecology* 78 (1): 188-201.
- Okamura, Y., Kimura, T., Yokouchi, H., Meneses-Osorio, M., Katoh, M., Matsunaga, T., et al.** (2010). Isolation and characterization of a GDSL esterase from the metagenome of a marine sponge-associated bacteria. *Marine Biotechnology* 12 (4): 395-402.
- Ouyang, L.-M., Liu, J.-Y., Qiao, M., Xu, J.-H.** (2013). Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Applied Biochemical Biotechnology* 169 (1): 15-28.
- Park, S.-Y., Shin, H.-J., Kim, G.-J.** (2011). Screening and Identification of a Novel Esterase EstPE from a Metagenomic DNA Library. *Journal of Microbiology* 49 (1): 7-14.
- Pérez, D., Kovacic, F., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E., García, M.T., Ventosa, A., et al.** (2012). Identification of amino acids involved in the hydrolytic activity of lipase LipBL from *Marinobacter lipolyticus*. *Microbiology (United Kingdom)* 158 (8): 2192-2203.
- Petersen, E.I., Valinger, G., Sölkner, B., Stubenrauch, G., Schwab, H.** (2001). A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to β -lactamases and DD-peptidases. *Journal of Biotechnology* 89 (1): 11-25.
- Petersen, T.N., Brunak, S., Von Heijne, G., Nielsen, H.** (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8 (10): 785-786.
- Rahman, R.N.Z.R.A., Leow, T.C., Salleh, A.B., Basri, M.** (2007). *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. *BMC Microbiology* 7: 77.

Ramírez, A., Rial, M.L., Ramírez, J.A. (2007). La aguas minero-medicinales de Galicia: un patrimonio geológico singular. *De Re Metallica* 8: 49-64.

Ranjan, R., Grover, A., Kapardar, R.K., Sharma, R. (2005). Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335(1): 57-65.

Rashmuse, K., Magomani, V., Ronneburg, T., Brady, D. (2009). A novel family VIII carboxylesterase derived from a leachate metagenome library exhibits promiscuous β -lactamase activity on nitrocefin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83 (3): 491-500.

Reddy, T.B.K., Thomas, A.D., Stamatis, D., Bertsch, J., Isbandi, M., Jansson, J., et al. (2015). The Genomes OnLine Database (GOLD) v.5: A metadata management system based on a four level (meta)genome project classification. *Nucleic Acids Research* 43(1):1099-1106.

Rhee, J.-K., Ahn, D.-G., Kim, Y.-G., Oh, J.-W. (2005). New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Applied Environmental Microbiology* 71 (2): 817-825.

Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics* 38: 525-552.

Schloss, P.D., Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology* 14 (3): 303-310.

Schoenfeld, T., Patterson, M., Richardson, P.M., Wommack, K.E., Young, M., Mead, D. (2008). Assembly of viral metagenomes from Yellowstone hot springs. *Applied Environmental Microbiology* 74 (13): 4164-4174.

Schröder, C., Elleuche, S., Blank, S., Antranikian, G. (2014). Characterization of a heat-active archaeal β -glucosidase from a hydrothermal spring metagenome. *Enzyme Microbial Technology* 57: 48-54.

Schütte, M., Fetzner, S. (2007). EstA from *Arthrobacter nitroguajacolicus* Rü61a, a thermo- and solvent-tolerant carboxylesterase related to class C β -lactamases. *Current Microbiology* 54 (3): 230-236.

Selvin, J., Kennedy, J., Lejon, D.P.H., Kiran, G.S., Dobson, A.D.W. (2012). Isolation identification and biochemical characterization of a novel halo-tolerant lipase from the metagenome of the marine sponge *Haliclona simulans*. *Microbial Cell Factories* 11:72.

- Sharma, P.K., Singh, K., Singh, R., Capalash, N., Ali, A., Mohammad, O., et al.** (2012). Characterization of a thermostable lipase showing loss of secondary structure at ambient temperature. *Molecular Biology Reports* 39 (3): 2795-2804.
- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F., Hajibabaei, M.** (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology* 21 (8): 1794-1805.
- Simon, C., Daniel, R.** (2011). Metagenomic analyses: Past and future trends. *Applied Environmental Microbiology* 77 (4): 1153-1161.
- Soliman, N.A., Knoll, M., Abdel-Fattah, Y.R., Schmid, R.D., Lange, S.** (2007). Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. *Process Biochemistry* 42 (7): 1090-1100.
- Soliman, N.A., Gaballa, A.A.** (2013). A molecular study on thermostable carboxyl esterase and esterase/acylaminoacyl-peptidase enzymes of *Geobacillus thermoleovorans* YN. *Research Journal of Biotechnology* 8 (4): 2-10.
- Srivastava, J., Naraian, R., Kalra, S.J.S., Chandra, H.** (2014). Advances in microbial bioremediation and the factors influencing the process. *International Journal of Environmental Science and Technology* 11 (6): 1787-1800.
- Takehara, M., Kinoshita, K., Miyamoto, M., Hirohara, H.** (2012). A novel alkaline esterase from *Sporosarcina* sp. nov. strain eSP04 catalyzing the hydrolysis of a wide variety of aryl-carboxylic acid esters. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 76 (9): 1721-1727.
- Tayyab, M., Rashid, N., Akhtar, M.** (2011). Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: Cloning and characterization of the lipase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111 (3): 272-278.
- Tekedar, H.C., Sanli-Mohamed, G.** (2011). Molecular cloning, over expression and characterization of thermoalkalophilic esterases isolated from *Geobacillus* sp. *Extremophiles* 15 (2): 203-211.
- Tirawongsaroj, P., Sriprang, R., Harnpicharnchai, P., Thongaram, T., Champreda, V., Tanapongpipat, S., et al.** (2008). Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *Journal of Biotechnology* 133 (1): 42-49.

Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., et al. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428 (6978): 37-43.

Uhlik, O., Leewis, M.-C., Strejcek, M., Musilova, L., Mackova, M., Leigh, M.B., et al. (2013). Stable isotope probing in the metagenomics era: A bridge towards improved bioremediation. *Biotechnology Advances* 31 (2): 154-165.

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., et al. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304 (5667): 66-74.

Wagner, U.G., Petersen, E.I., Schwab, H., Kratky, C. (2002). EstB from *Burkholderia gladioli*: A novel esterase with a β -lactamase fold reveals steric factors to discriminate between esterolytic and β -lactam cleaving activity. *Protein Science* 11 (3): 467-478.

Wang, H., Gong, Y., Xie, W., Xiao, W., Wang, J., Zheng, Y., et al. (2011). Identification and characterization of a novel thermostable gh-57 gene from metagenomic fosmid library of the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164 (8): 1323-1338.

Wei, P., Bai, L., Song, W., Hao, G. (2009). Characterization of two soil metagenome-derived lipases with high specificity for p-nitrophenyl palmitate. *Archives of Microbiology* 191 (3): 233-240.

Wemheuer, B., Taube, R., Akyol, P., Wemheuer, F., Daniel, R. (2013). Microbial diversity and biochemical potential encoded by thermal spring metagenomes derived from the Kamchatka peninsula. *Archaea* 2013: 136714.

Wu, C., Sun, B. (2009). Identification of novel esterase from metagenomic library of Yangtze river. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (1): 187-193.

Yang, Z., Zhang, Y., Shen, T., Xie, Y., Mao, Y., Ji, C. (2013). Cloning, expression and biochemical characterization of a novel, moderately thermostable GDSL family esterase from *Geobacillus thermodenitrificans* T2. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 115 (2): 133-137.

Yu, E.Y., Kwon, M.-A., Lee, M., Oh, J.Y., Choi, J.-E., Lee, J.Y., et al. (2011). Isolation and characterization of cold-active family VIII esterases from an arctic soil metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90 (2): 573-581.

Zhang, Y., Pengjun, S., Wanli, L., Kun, M., Yingguo, B., Guozeng, W., et al. (2009). Lipase diversity in glacier soil based on analysis of metagenomic DNA fragments and cell culture. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (9): 888-897.

Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied Environmental Microbiology* 62 (2): 316-322.

Zhou, J., He, Z., Yang, Y., Deng, Y., Tringe, S.G., Alvarez-Cohen, L. (2015). High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: Open and closed formats. *mBio* 2015; 6 (1): e02288-14.

Zhu, W., Lomsadze, A., Borodovsky, M. (2010). *Ab initio* gene identification in metagenomic sequences. *Nucleic Acids Research* 38 (12).

Zhu, Y., Liu, G., Li, H., Liu, J., Bai, X., Guan, R., et al. (2012). Cloning and characterization of a thermostable carboxylesterase from inshore hot spring thermophile *Geobacillus* sp. ZH1. *Acta Oceanologica Sinica* 31 (6): 117-126.

Zhu, Y., Li, J., Cai, H., Ni, H., Xiao, A., Hou, L. (2013). Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library. *Microbiological Research* 168 (9): 589-597.

CONCLUSIONES FINALES

Las conclusiones del trabajo realizado para esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. Se construyeron dos cepas productoras de enzimas lipolíticas de *Thermus thermophilus* HB27 empleando un sistema de expresión con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 y el plásmido YEpFLAG-1.
 - 1.1. La esterasa YP 004875 fue clonada en dicho sistema de expresión, a excepción de su señal de secreción nativa. La esterasa recombinante mostró preferencia por p-nitrofenil ésteres de cadena lateral de longitud media-corta y cinética tipo Michaelis-Menten, de acuerdo con el comportamiento característico de las esterases. La enzima recombinante, que está N-glicosilada, exhibió una alta termoestabilidad y actividad óptima a 40°C y valores alcalinos de pH, propiedades que demuestran su potencial para aplicaciones biotecnológicas. Su producción por la cepa de levadura recombinante alcanzó niveles de actividad extracelular 10 veces mayores que con *T. thermophilus* HB27 a pesar de que el 80% de la enzima queda retenida en el espacio periplásmico.
 - 1.2. La lipasa putativa YP 005592 fue seleccionada por ser la única anotada como lipasa en el genoma de *T. thermophilus* HB27. Esta enzima presentaba similitud de secuencia con fosfatasa de la superfamilia HAD. La producción y secreción de esta enzima por la levadura recombinante fue confirmada por SDS-PAGE y Western blot, pero el medio extracelular no mostró actividad lipolítica, aunque sí actividad fosfatasa superior al control.
 - 1.3. En los experimentos de cristalización con la esterasa se observó que la glicosilación que presentaba debido a su expresión en levaduras era un impedimento para la formación de cristales. Los mejores resultados se obtuvieron con una versión mutada de esterasa mutante, en la que los residuos de asparagina de las dos dianas de glicosilación fueron sustituidos por glutamina, con la que se obtuvieron cristales en forma de placa en presencia de PEG 400 40-42 % y acetato de litio 0.2 M.
2. Se construyó una genoteca de expresión de alrededor de 1000 clones de *T. thermophilus* empleando el fósido pCC1FOS y *E. coli* como hospedador. La búsqueda funcional de actividad lipolítica detectó dos clones positivos que contenían la misma enzima, la esterasa YP 004875 expresada previamente, por lo que probablemente sea la única enzima lipolítica de *T. thermophilus* HB27 cuya expresión sea compatible con la maquinaria de expresión de *E. coli*, expresándose bajo su propio promotor.
3. Se construyeron dos metagenotecas a partir del manantial termal de Rio Caldo (Lobios, Ourense):

Conclusiones finales

- 3.1. Se construyó una primera metagenoteca de 9210 clones a partir de un cultivo de enriquecimiento inoculado con sedimentos procedentes del manantial termal, empleando aceite de oliva como única fuente de carbono. La búsqueda funcional de actividad lipolítica detectó 161 clones positivos, la mayoría de ellos procedentes de cepas del género *Geobacillus* cuyas enzimas lipolíticas han sido estudiadas previamente.
- 3.2. Se construyó una segunda metagenoteca de 11600 clones a partir de ADN metagenómico extraído de las aguas termales del manantial Río Caldo (Lobios, Ourense). La búsqueda funcional de actividad lipolítica detectó 6 clones positivos. El clon FOS 4, seleccionado por el ser el primero en mostrar actividad, expresaba una nueva esterasa, que se denominó LOB4Est, perteneciente a la familia VIII de enzimas lipolíticas. El gen de dicha enzima fue clonado en un sistema de expresión con la levadura *S. cerevisiae* y el plásmido YepFLAG-1 y se expresó de manera funcional y mostró una especificidad de sustrato amplia para p-nitrofenil ésteres de cadena lateral de longitud media-corta, actividad máxima a 40°C y pH 7.5 en el rango de las condiciones ensayadas y una vida media de 1.71 h a 50°C, a pesar de su origen termal.

ANEXO I: Resumen

Resumen

El descubrimiento de enzimas lipolíticas con nuevas y/o mejores características es clave para la optimización de biotransformaciones de interés industrial o biotecnológico. Las enzimas termófilas presentan una serie de ventajas como mayor estabilidad frente a altas temperaturas, pH extremos y agentes desnaturalizantes.

En este trabajo se estudiaron las enzimas lipolíticas de *Thermus thermophilus* HB27. Se seleccionaron dos enzimas lipolíticas de la secuencia de su genoma y se expresaron en *Saccharomyces cerevisiae*. Únicamente la esterasa, previamente identificada, se expresó de forma funcional, termoestable y activa a temperaturas mesófilas, ofreciendo mayor rendimiento de producción que la cepa original. También se construyó una genoteca de expresión con el fósido pCC1FOS, cuyos clones positivos únicamente expresaban dicha esterasa.

Alternativamente se buscaron enzimas lipolíticas en el manantial termal de Rio Caldo (Ourense) mediante metagenómica funcional empleando el fósido pCC1FOS. En la metagenoteca de un cultivo de enriquecimiento (aceite de oliva como única fuente de carbono), inoculado con sedimentos, se encontraron más de 100 clones positivos, la mayoría con enzimas lipolíticas del género *Geobacillus*, estudiadas con anterioridad. En la metagenoteca del agua uno de los 6 clones positivos detectados expresaba una nueva esterasa de la familia VIII, con características mesófilas a pesar de su origen termal.

Resumo

O descubrimento de encimas lipolíticas con novas e/ou mellores características é clave para a optimización das biotransformacións de interese industrial ou biotecnolóxico. As encimas termófilas presentan ademáis unha serie de vantaxes como maior estabilidade fronte a altas temperaturas, pH extremos e axentes desnaturalizantes.

Neste traballo estudáronse as encimas lipolíticas de *Thermus thermophilus* HB27. Seleccionáronse dúas encimas lipolíticas da secuencia do seu xenoma e expresáronse en *Saccharomyces cerevisiae*. Unicamente a esterasa, previamente identificada, expresouse de forma funcional, termoestable e activa a temperaturas mesófilas, ofrecendo maior rendemento de produción que a cepa orixinal. Tamén se construíu una xenoteca de expresión co fósido pCC1FOS na que unicamente se encontraron clons positivos que expresaban a devandita esterasa.

Alternativamente buscáronse encimas lipolíticas no manancial termal de Río Caldo (Ourense) mediante metaxenómica funcional empregando o fósido PCC1FOS. Na metaxenoteca dun cultivo de enriquecemento (aceite de oliva como única fonte de carbono), inoculado con sedimentos do manancial, atopáronse máis de 100 clons positivos, a maioría con encimas lipolíticas do xénero *Geobacillus*, estudadas con anterioridade. Na metaxenoteca da mostra de auga encontráronse 6 clons positivos. Un deles expresaba una nova esterasa da familia VIII, con características mesófilas a pesar da súa orixe.

Abstract

The discovery of novel lipolytic enzymes with new and/or improved features is the key to the optimization of industrial and biotechnological biotransformations. Thermophilic enzymes exhibit advantages such as stability at high temperatures, extreme pH values and denaturing agents.

In this work, lipolytic enzymes from *Thermus thermophilus* were studied. Two selected lipolytic enzymes were expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Only the esterase, previously identified, was functionally expressed as a thermostable enzyme with activity at mesophilic temperature. The recombinant yeast strain provided higher production yields than *T. thermophilus*. A genomic library was constructed with pCC1FOS fosmid and two positive lipolytic clones were detected. Both contained the mentioned esterase.

Alternatively, lipolytic enzymes were studied in the thermal spring Rio Caldo (Ourense) by functional metagenomic using pCC1FOS fosmid. In the metagenomic library from an enrichment culture (with olive oil as sole carbon source), inoculated with sediments from the spring, 140 positives lipolytic clones were detected. Most of them expressed *Geobacillus* lipolytic enzymes. In the metagenomic library from water 6 positive clones were detected. One of them expressed a novel esterase from family VIII with mesophilic-like features despite of its thermal origin.

ANEXO II: *Curriculum vitae*

Curriculum vitae **Olalla López López**

Formación Académica

Titulación Superior	Centro	Fecha
Licenciatura en Biología Nota media del expediente: 2.54 sobre 4	Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña	Junio 2007
Tesina	Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña	17/07/2009
D.E.A. Programa de Doctorado “Xenética, Bioquímica e Biotecnoloxía” (Bienio 2007-2009)	Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña	16/07/2009

Idiomas

Castellano y gallego nativo.

Posesión del título “First Certificate in English” con una calificación de B.

Experiencia laboral

Tipo de contrato/Beca	Institución	Fecha
Contratada con cargo al Programa de Consolidación EXPRELA-2012.	Lab. de Bioquímica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.	01/09/2013-31/10/2013
Contratada con cargo a proyecto FUAC-Proteos Biotech	Lab. de Bioquímica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.	15/04/2013-31/07/13
Contratada con cargo a proyecto FUAC-Proteos Biotech	Lab. de Bioquímica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.	29/10/2012-02/02/2013
Contratada con cargo a proyecto 09MDS037383PR	Lab. de Bioquímica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.	01/07/2012-30/09/2012
Contratada Programa María Barbeito	Lab. de Bioquímica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.	22/01/2010-26/06/2012
Becaria Tercer Ciclo de la XUNTA	Lab. de Bioquímica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.	05/12/2008-30/09/2009
Contratada con cargo a proyecto PGIDIT06REM38202PR	Lab. de Bioquímica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.	13/11/2007-04/12/2008

Participación en Proyectos de I+D financiados en Convocatorias públicas

Proyecto “Biosíntesis heteróloga de enzimas termofílicas para la producción de biodiésel” (subproyecto 2 de PGIDIT06REM38202PR, Proyecto coordinado “Un nuevo procedimiento para la producción de biodiésel a partir de aceites usados de frituras con enzimas termofílicas”).

Entidad financiadora: Xunta de Galicia. Entidades participantes: Universidade da Coruña, Universidade de Vigo. Duración: 2006-2009.

Investigador responsable: González Siso M.I.

Proyecto “Metaxenómica funcional para a procura de novos enzimas de interese industrial a partir de fontes xeotermiais galegas” (subproyecto 2 de 09MDS037383PR, Proyecto coordinado “Búsqueda de novos catalizadores para a resolución de principios activos quirais a partir de fontes xeotermiais galegas”).

Entidad financiadora: Xunta de Galicia. Entidades participantes: Universidade de Vigo, Universidade da Coruña, GalChimia. Duración: Septiembre 2010 - Septiembre 2012.

Investigador responsable: M^a Isabel González Siso.

Participación en contratos de I+D de especial relevancia con Empresas y/o Administraciones (nacionales y/o internacionales)

Título del contrato/proyecto: “Desarrollo de sistemas de expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* de péptidos antimicrobianos y queratinasa”.

Tipo de contrato: contrato con cargo a proyecto

Empresa/Administración financiadora: Proteos Biotech, S.L. Entidades participantes: : Proteos Biotech, S.L. y Universidade da Coruña . Duración, Agosto 2012 – Julio 2013.

Investigador responsable: M.I. González Siso. Número de investigadores participantes: 3

Publicaciones científicas

López-López, Olalla; Cerdán, M. Esperanza; González-Siso, M. Isabel. (2014). Hot springs Metagenomics. *Life*, 2: 308-320.

Fuciños, Pablo; Atanes, Estrella; López-López, Olalla; Solaroli, Michele; Cerdán, M. Esperanza; González-Siso, M. Isabel; Pastrana, Lorenzo; Rúa, M. Luisa. Expression, purification and characterization of an oligomeric His-tagged thermophilic esterase from *Thermus thermophilus* HB27 (2014). *Process Biochemistry*, 49: 927-935.

López-López, Olalla; Cerdán, M. Esperanza; González-Siso, M. Isabel (2014). New extremophilic lipases and esterases from Metagenomics. *Current Protein and Peptide Science*, 15: 445-455. Fuciños, Pablo; Atanes, Estrella; López-López, Olalla; Cerdán, M. Esperanza; González-Siso, M. Isabel; Pastrana, Lorenzo; Rúa, M. Luisa (2011). Production

and characterization of two N-terminal truncated esterases from *Thermus thermophilus* HB27 in a mesophilic yeast: effect of N-terminus in thermal activity and stability. *Protein Expression and Purification*, 78. 120-130.

López-López, Olalla; Fuciños, Pablo; Pastrana, Lorenzo; Rúa, M. Luisa; Cerdán, M. Esperanza; González-Siso, M. Isabel (2010). Heterologous expression of an esterase from *Thermus thermophilus* HB27 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 145: 226-232.

Escuder, Juan José; López López, Olalla; Becerra, Manuel; Cerdán, M. Esperanza; González Siso, M. Isabel. (2015). Extremophilic esterases for bioprocessing of lignocellulosic feedstocks in *Extremophilic bioprocessing of lignocellulosic feedstocks to biofuels, value-added products, and usable power*. Springer (enviado).

Publicaciones científicas en preparación

López-López, Olalla; Knapik, Kamila; Cerdán, M. Esperanza; González-Siso, M. Isabel (2015). Metagenomics of an alkaline hot spring reveals predominance of bacteria over archaea and a new thermostable family VIII esterase with unusual broad substrate specificity and operational pH range (en preparación).

López-López, Olalla; Cerdán, M. Esperanza; González Siso, M. Isabel. *Thermus thermophilus* as source of thermophilic lipolytic enzymes. *Microorganisms* (en preparación)

Patentes

Inventores (p.o. alfabético): Cerdán M.E., Fuciños P., González Siso M.I., López López O., Pastrana L., Rúa M.L.

Título: Esterasa termófila de *Thermus thermophilus*.

N. de solicitud: P200801767 País de prioridad: España Fecha de prioridad: 13-06-2008

Entidad titular: Universidade da Coruña y Universidade de Vigo.

Países a los que se ha extendido: PCT/ES/2009/070215

Empresa/s que la están explotando: convenio de explotación con Proteos Biotech.

Inventores (p.o. alfabético): Cerdán M.E., Fuciños P., González Siso M.I., López López O., Pastrana L., Rúa M.L.

Título: Lipasa termófila de *Thermus thermophilus*.

N. de solicitud: P200900613 País de prioridad: España Fecha de prioridad: 09-04-2009

Entidad titular: Universidade da Coruña y Universidade de Vigo.

Contribuciones a congresos

López-López O., Fernández-Leiro R., Atanes E., Fuciños P., Pastrana L.M., Rúa M.L., Cerdán M.E., González Siso M.I. Póster: Producción heteróloga de una esterasa termófila por *Saccharomyces cerevisiae*. Congreso: XXXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Bilbao, 10-13/09/2008

López-López, O., Fuciños, P., Pastrana, L.M., Rúa M.L., M. E. Cerdán, M.I. González Siso. Póster: Heterologous expression of a thermophilic putative lipase from *Thermus thermophilus* HB27 in *Saccharomyces cerevisiae*. Congreso: 27th International Specialized Symposium on Yeasts. París, 26-29/08/2009

López-López, O., Fuciños, P., Pastrana, L.M., Rúa M.L., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I. Póster: Clonación, expresión heteróloga, purificación y caracterización bioquímica de una lipasa putativa de *Thermus thermophilus* HB27 en *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505. Congreso: XXXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Oviedo, 23-26/09/2009

López-López, O., Fuciños, P., Pastrana, L.M., Rúa M.L., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I. Póster: A comparative expression analysis of a thermophilic putative lipase in mesophilic hosts. Congreso: International Yeast Model Convention 2010, a tribute to P. Slonimski. Rome (Italy), 22-25/09/2010.

López-López, O., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I. Póster: Clonación y caracterización de una carboxilesterasa de *Thermus thermophilus* HB27 en *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505. Congreso: XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona, 5-8/09/2011

Fuciños P., González R., Rúa M.L., López-López O., González-Siso M.I., Cerdán M.E., Rodríguez R., Pampín B. Póster: Reactivity of a recombinant esterase from *Thermus thermophilus* HB27 in aqueous and organic media. Congreso: Biotrans 2001 – 10th International Symposium on Biocatalysis. Sicily (Italy), 2-6/10/2011

López-López, O., Fuciños, P., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I. Póster: Functional metagenomics: enrichment culture vs. direct isolation. A practical case. Congreso: 22nd IUBMB and 37th FEBS Congress From Single Molecules to Systems Biology. Sevilla, 4-9/09/2012.

López-López, O., P., Cerdán, M.E., González-Siso, M.I. Póster y presentación oral para el "poster tour": Nueva enzima procedente de aguas termales. Congreso: XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, 3-6/09/2013

Cursos y seminarios

Curso “Análisis de la Expresión génica y sus Aplicaciones”.

Lugar de celebración y fecha: A Coruña, Facultad de Ciencias 3-9/07/2008.

Entidad organizadora: Universidade da Coruña, Departamento de Bioloxía Celular e Molecular.

Tipo de curso y duración: Teórico-práctico, 20 horas.

Seminario “Biotecnología e industrias lácteas: valorización de residuos”.

Lugar de celebración y fecha: Fundación Luis Seoane, A Coruña 15-17/07/2009.

Entidad organizadora: Universidad Internacional Menéndez Pelayo.

Tipo de curso y duración: Seminarios, 20 horas.

Curso “II hands on course in Proteins and Proteomics”

Lugar de celebración y fecha: Facultade de Ciéncias e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal 7-18/09/2009.

Entidad Organizadora: Universidade Nova de Lisboa.

Tipo de curso y duración: Teórico-práctico, 58 horas.

II Curso de Bioinformática Estructural: Modelización y Simulación de Moléculas Biológicas.

Lugar de celebración y fecha: Aula Nova de Informática, Facultade de Dereito, Santiago de Compostela, 30 Nov-3 Dic 2009.

Entidad Organizadora: Universidade de Santiago de Compostela.

Tipo de Curso y duración: curso teórico-práctico 30 h.

Docencia impartida

60 h clases prácticas, asignatura Bioquímica I del Grado de Biología de la UDC, curso 2009/2010.

50 h clases prácticas, asignatura Bioquímica I del Grado de Biología de la UDC, curso 2010/2011.

30 h clases prácticas, asignatura Bioquímica II del Grado de Biología de la UDC, curso 2011/2012.

